



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, 9/12, A61K 48/00, 38/45, C12P 19/30	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/35024 (43) Date de publication internationale: 25 septembre 1997 (25.09.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00436 (22) Date de dépôt international: 12 mars 1997 (12.03.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/03267 15 mars 1996 (15.03.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BLANCHE, Francis [FR/FR]; 41, rue des Solitaires, F-75019 Paris (FR). CAMERON, Béatrice [FR/FR]; 6, rue Tournefort, F-75005 Paris (FR). COUDER, Michel [FR/FR]; 15, rue du Vert-Galant, F-94370 Sucy-en-Brie (FR). CROUZET, Joël [FR/FR]; 12, rue Michel-Voisin, F-92330 Sceaux (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-91165 Antony Cédex (FR).		(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: ENZYME COMBINATIONS FOR DESTROYING PROLIFERATIVE CELLS		
(54) Titre: COMBINAISONS D'ENZYMES POUR LA DESTRUCTION DES CELLULES PROLIFÉRATIVES		
(57) Abstract		
<p>Enzyme combinations useful for destroying cells, particularly proliferative cells, are disclosed. Vectors enabling the intracellular expression and transfer of said enzyme combinations, as well as the therapeutical use thereof, particularly in anti-cancer gene therapy, are also disclosed.</p>		
(57) Abrégé		
<p>La présente invention concerne des combinaisons d'enzymes, utilisables pour la destruction de cellules, notamment de cellules prolifératives. Elle concerne également des vecteurs permettant le transfert et l'expression intracellulaire de ces combinaisons d'enzymes, ainsi que leur utilisation thérapeutique, en particulier en thérapie génique anti-cancéreuse.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Combinaisons d'enzymes pour la destruction des cellules prolifératives

La présente invention concerne le domaine de la thérapie génique et cellulaire. Elle concerne en particulier des combinaisons d'enzymes, utilisables pour la destruction de cellules, notamment de cellules prolifératives. Elle concerne
5 Également des vecteurs permettant le transfert et l'expression intracellulaire de ces combinaisons d'enzymes, ainsi que leur utilisation thérapeutique, en particulier en thérapie génique anti-cancéreuse.

La thérapie génique, qui consiste à introduire dans un organisme ou une cellule une information génétique, a connu ces dernières années un développement
10 extraordinaire. L'identification de gènes impliqués dans des pathologies, la mise au point de vecteurs d'administration de gènes, le développement de systèmes d'expression contrôlés ou tissu-spécifiques notamment ont contribué au développement de ces nouvelles approches thérapeutiques. Ainsi, au cours des 5 dernières années, de nombreux essais cliniques de thérapie génique ou cellulaire
15 ont été entrepris en Europe comme aux États-Unis, dans des domaines tels que les maladies monogéniques (hémophilie, mucoviscidose), le cancer, les pathologies cardiovasculaires ou encore les troubles du système nerveux.

Dans le domaine des pathologies liées à une hyperprolifération cellulaire (cancer, resténose, etc), différentes approches ont été développées. Certaines
20 reposent sur l'utilisation de gènes suppresseur de tumeurs (p53, Rb), d'autres sur l'emploi d'antisens dirigés contre des oncogènes (myc, Ras), d'autres encore sur l'immunothérapie (administration d'antigènes tumoraux ou de cellules immunitaires spécifiques, etc). Une autre approche consiste à introduire dans les cellules concernées un gène toxique ou suicide capable d'induire la destruction
25 des dites cellules. De tels gènes sont par exemple des gènes susceptibles de

sensibiliser les cellules a un agent pharmaceutique. Il s'agit généralement de gènes codant pour des enzymes non mammifères et non toxiques qui, lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules de mammifères, transforment une prodrogue, initialement peu ou pas toxique, en un agent hautement toxique. Un tel

5 mécanisme d'activation de prodrogues est avantageux à plusieurs titres: il permet d'optimiser l'indice thérapeutique en ajustant la concentration en prodrogue ou l'expression de l'enzyme, d'interrompre la toxicité en n'administrant plus la prodrogue et d'évaluer le taux de mortalité. En outre, l'utilisation de ces gènes suicide offre l'avantage de ne pas être spécifique pour

10 un type particulier de tumeur, mais d'application générale. Ainsi, les stratégies basées sur l'utilisation de gènes suppresseurs de tumeurs ou d'antisens anti-oncogène sont applicables uniquement aux tumeurs présentant une déficience dans ledit gène suppresseur ou une surexpression dudit oncogène. De même, les approches basées sur l'immunothérapie doivent être développées patient par

15 patient, pour tenir compte des restrictions et des compétences immunitaires. Au contraire, une stratégie basée sur l'emploi d'un gène suicide est applicable à tout type de tumeur, et, plus généralement, à pratiquement tout type de cellule.

De nombreux gènes suicides sont décrits dans la littérature comme par exemple les gènes codant pour la cytosine désaminase, la purine nucléoside

20 phosphorylase ou la thymidine kinase comme par exemple les thymidines kinases du virus de la varicelle ou du virus de l'herpès simplex de type 1.

La cytosine désaminase de Escherichia coli est capable de catalyser la désamination de la cytosine en uracile. Les cellules qui expriment le gène de E. coli sont donc capables de convertir la 5-fluorocytosine en 5-fluorouracile, qui

25 est un métabolite toxique (Mullen et coll. 1992 Proc. Natl. Acad. USA 89 p33).

La purine nucléoside phosphorylase de Escherichia coli permet la conversion d'analogues non toxiques de déoxyadénosine en analogues d'adénine très toxiques. Comme l'enzyme eucaryote ne présente pas cette activité, si les cellules mammifères expriment le gène bactérien les analogues de déoxyadénine
5 tels que le 6-méthyle-purine-2'-déoxyribo-nucléoside est transformé en produit toxique pour ces cellules (Sorscher et coll. 1994 Gene Therapy 1 p233).

La thymidine kinase du virus de la varicelle permet la monophosphorylation du 6-méthoxypurine arabinoside. Si les cellules mammifères expriment ce gène viral, ce monophosphate est produit puis
10 métabolisé par les enzymes cellulaires en un composé toxique (Huber et coll. 1991 Proc. Natl. Acad. USA 88 p8039).

Parmi ces gènes, le gène codant pour la thymidine kinase (TK) est tout particulièrement intéressant sur le plan thérapeutique car, à la différence des autres gènes suicides, il génère une enzyme capable d'éliminer spécifiquement
15 les cellules en cours de division, puisque la prodrogue est transformée en un produit non diffusible qui inhibe la synthèse d'ADN. La thymidine kinase virale, et notamment les thymidines kinases du virus de la varicelle ou du virus de l'herpès simplex de type 1 ont une spécificité de substrat différente de
20 l'enzyme cellulaire, et il a été montré qu'elles étaient la cible d'analogues de guanosine tels que l'acyclovir ou le ganciclovir (Moolten 1986 Cancer Res. 46 p5276). Ainsi, le ganciclovir est phosphorylé en ganciclovir monophosphate uniquement quand les cellules mammifères produisent l'enzyme HSV1-TK, puis des kinases cellulaires permettent la métabolisation du ganciclovir monophosphate en diphosphate puis triphosphate qui provoque l'arrêt de la
25 synthèse d'ADN et conduit à la mort de la cellule (Moolten 1986 Cancer Res. 46

p5276 ; Mullen 1994 Pharmac. Ther. 63 p199). Le même mécanisme se produit avec d'autres thymidine kinases et d'autres analogues de guanosine.

Par ailleurs, un effet de toxicité propagée (effet "by-stander") a été observé lors de l'utilisation de la TK. Cet effet se manifeste par la destruction
5 non seulement des cellules ayant incorporé le gène TK, mais également des cellules avoisinantes. Le mécanisme de ce processus peut s'expliquer de trois façons : i) la formation de vésicules apoptotiques qui contiennent du ganciclovir phosphorylé ou la thymidine kinase, provenant des cellules mortes, puis la phagocytose de ces vésicules par les cellules voisines; ii) le passage de
10 prodrogue métabolisée par la thymidine kinase, par un processus de coopération métabolique des cellules contenant le gène suicide vers les cellules ne le contenant pas et/ou iii) une réponse immunitaire liée à la régression de la tumeur (Marini et coll. 1995 Gene Therapy 2 p655).

Pour l'Homme de l'art, l'utilisation du gène suicide codant pour la
15 thymidine kinase du virus de l'herpès est très largement documentée. En particulier, les premières études in vivo sur des rats ayant un gliome montrent des régressions de tumeur lorsque le gène HSV1-TK est exprimé et que des doses de 150 mg/kg de ganciclovir sont injectées [K. Culver et coll. 1992 Science 256 p1550]. Toutefois, ces doses sont hautement toxiques chez la souris [T. Osaki
20 et coll. 1994 Cancer Research 54 p5258] et donc totalement proscrites en thérapie génique chez l'Homme.

Un certain nombre d'essais thérapeutiques sont également en cours chez l'homme, dans lesquels le gène TK est délivré aux cellules au moyen de différents vecteurs tels que notamment des vecteurs rétroviraux ou adénoviraux.
25 Dans les essais cliniques de thérapie génique chez l'Homme, ce sont des doses

beaucoup plus faibles qui doivent être administrées, de l'ordre de 5 mg/kg et pour une durée du traitement courte (14 jours) (E. Oldfield et coll. 1995 Human Gene Therapy 6 p55). Pour des doses plus élevées ou des traitements plus prolongés dans le temps, des effets secondaires indésirables de toxicité sont en effet observés.

Pour remédier à ces inconvénients, il a été proposé de synthétiser des dérivés de la thymidine kinase plus spécifiques ou plus actifs pour phosphoryler les analogues de guanosine. Ainsi ont été décrits des dérivés obtenus par mutagenèse dirigée. Toutefois, aucune caractérisation biochimique précise sur les enzymes pures n'a été réalisée, aucun test cellulaire utilisant ces mutants n'a été publié et aucune amélioration fonctionnelle n'a été rapportée (WO95/30007; Black et coll., 1993 Biochemistry 32 p11618). En outre, l'expression inducible d'un gène HSV1-TK, délété de ses 45 premiers codons, a été réalisée dans des cellules eucaryotes mais les doses en prodrogue utilisées demeurent comparables à celles décrites dans tous les essais de la littérature (B. Salomon et coll. 1995 Mol. Cell. Biol. 15 p5322). En conséquence, aucun des variants décrits jusqu'ici ne présente une activité améliorée à l'égard de la thymidine ou vis à vis du ganciclovir.

La présente invention propose une méthode améliorée de thérapie génique par gène suicide. La présente invention décrit en particulier une méthode permettant d'améliorer l'efficacité de phosphorylation des analogues de guanosine par les thymidine kinase et ainsi, d'améliorer le potentiel thérapeutique de ce traitement. La présente invention propose notamment une méthode pour triphosphoryler des analogues de nucléosides tels que le ganciclovir ou l'acyclovir pour que la triphosphorylation de ces analogues soit très significativement augmentée à des doses de ganciclovir (resp. acyclovir) i)

significativement plus faibles ; ii) ou susceptibles de provoquer un effet "by-stander" plus prononcé ; iii) ou bien ne conduisant pas à une toxicité cellulaire qui pourrait se produire lorsque la thymidine kinase sauvage est surexprimée .

5 Cette methode peut etre appliquée au cancer, aux maladies cardiovasculaires, ou à toute application nécessitant la mort de certaines cellules telles que des cellules infectées par un virus ; ce virus peut être un virus de type VIH (virus d'immunodéficience humain), CMV (cytomegalovirus) VCR (virus respiratoire syncytial).

10 La presente invention repose en particulier sur l'utilisation d'une combinaison d'enzymes, permettant d'améliorer in vivo la reaction de phosphorylation des analogues de nucleosides.

Un premier objet de l'invention reside donc dans une composition comprenant :

- 15 - une enzyme capable de phosphoryler un analogue de nucleoside, pour generer un analogue monophosphate,
- une enzyme capable de phosphoryler ledit analogue monophosphate, pour generer un analogue diphosphate, et,
- une enzyme capable de phosphoryler ledit analogue diphosphate, pour generer un analogue triphosphate toxique.

20 Plus particulierement, l'enzyme capable de phosphoryler un analogue de nucleoside, pour generer un analogue monophosphate est une thymidine kinase, l'enzyme capable de phosphoryler ledit analogue monophosphate, pour generer un analogue diphosphate est une guanylate kinase et l'enzyme capable de

phosphoryler ledit analogue diphosphate pour generer un analogue triphosphate est une nucléoside diphosphate kinase. Par ailleurs, les compositions selon l'invention peuvent comprendre, non pas directement l'enzyme, mais un acide nucleique codant pour l'enzyme. A cet egard, 5 l'invention a egalement pour objet une composition utilisable pour la delivrance et la production in vivo d'une combinaison d'enzymes, comprenant:

- . un premier acide nucleique codant pour une enzyme capable de phosphoryler un analogue de nucleoside, pour generer un analogue monophosphate,
- 10 - un deuxieme acide nucleique codant pour une enzyme capable de phosphoryler ledit analogue monophosphate, pour generer un analogue diphosphate, et,
- un troisieme acide nucleique codant pour une enzyme capable de phosphoryler ledit analogue diphosphate, pour generer un analogue 15 triphosphate toxique.

Avantageusement, le premier acide nucleique code pour une thymidine kinase, le deuxieme acide nucleique code pour une guanylate kinase et le troisieme acide nucleique code pour une nucléoside diphosphate kinase.

L'analogue de nucleoside est generalement un analogue de guanosine, tel que 20 par exemple le ganciclovir, l'acyclovir ou le penciclovir. D'autres analogues de nucleosides sont par exemple des composés de type trifluorothymidine, 1-[2-deoxy, 2-fluoro, beta-D-arabino furanosyl]-5-iodouracil, ara-A, 1-beta-D-arabinofuranosyl thymidine (araT), 5-éthyl-2'déoxyuridine, iodouridine, AZT, AIU, didéoxycytidine, AraC et le bromovinyl-désoxyuridine (BVDU). Les

analogues preferes sont le ganciclovir, l'acyclovir, le penciclovir et le BVDU, de preference le ganciclovir et l'acyclovir. La forme triphosphatée est toxique en ce sens qu'elle entraine, directement ou indirectement, la mort cellulaire.

Lorsque les cellules de mammifères, modifiées pour exprimer la
5 thymidine kinase (HSV1-TK par exemple), sont mises en presence d'un
analogue de nucleoside (ganciclovir par exemple), elles deviennent capables
d'effectuer la phosphorylation du ganciclovir pour conduire au ganciclovir
monophosphate. Ultérieurement, des kinases cellulaires permettent la
métabolisation de ce ganciclovir monophosphate sucessivement en diphosphate
10 puis triphosphate. Le ganciclovir triphosphate ainsi généré, produit alors des
effets toxiques en s'incorporant à l'ADN et inhibe en partie l'ADN polymérase
alpha cellulaire ce qui provoque l'arrêt de la synthèse d'ADN et donc conduit à
la mort de la cellule. Dans ce mecanisme, l'etape de monophosphorylation de
l'analogue de nucleoside est considerée comme l'etape limitante. C'est pour cette
15 raison que differentes approches ont été decrites dans l'art anterieur pour tenter
d'ameliorer les proprietes intrinseques de la thymidine kinase (creation de
mutants de la TK, recherche de systemes d'expression et d'administration plus
performants, etc).

La presente invention montre maintenant qu'il est possible d'ameliorer
20 l'efficacite du traitement en administrant, en combinaison avec une thymidine
kinase, d'autres enzymes impliquées dans la phosphorylation des analogues de
nucleosides. La presente invention a ainsi pour objet differentes combinaisons
d'enzymes permettant d'optimiser la reaction intracellulaire de
triphosphorylation d'analogues de nucleosides. Un autre aspect de la presente
25 invention concerne des vecteurs permettant l'introduction et l'expression
intracellulaire de ces combinaisons d'enzymes. Il peut s'agir en particulier de

plusieurs vecteurs permettant chacun la production d'une enzyme, ou d'un ou plusieurs vecteurs permettant chacun la production de plusieurs enzymes ou de toutes les enzymes. La presente invention concerne egalement un procede de triphosphorylation d'analogues de nucleosides en presence d'une combinaison
5 d'enzymes, eventuellement produites in situ par expression de genes correspondants, ainsi qu'un procede pour la destruction de cellules proliferatives.

La phosphorylation des nucléosides monophosphates en nucléosides diphosphates puis triphosphates a été documentée in vitro. Ces
10 phosphorylations sont effectuées en présence i) de lysat d'érythrocytes humains dans le cas du ganciclovir (Cheng et coll. 1983 J. Biol. Chem. 258 p12460) ou ii) de préparations enzymatiques de la guanylate kinase et de la nucléoside diphosphate kinase d'érythrocytes humains, dans le cas du ganciclovir et de l'acyclovir (Miller et coll. 1980 J. Biol. Chem. 255 p720 ; Smée et coll. 1985
15 Biochem. Pharmac. 34 p1049). Bien que la phosphorylation des nucléosides monophosphates en diphosphates puis triphosphates ait été mise en évidence dans les cellules mammifères, ces conversions ne semblent pas totales avec le ganciclovir monophosphate ou l'acyclovir monophosphate (Agbaria et coll. 1994 Mol. Pharmacol. 45 p777; Caruso et coll. 1995 Virology 206 p495; Salomon et coll.
20 1995 Mol. Cell. Biol. 15 p5322).

La presente demande decrit maintenant des compositions permettant d'ameliorer l'efficacite therapeutique d'un thymidine kinase in vivo.

La premiere enzyme utilisée dans les compositions et methodes selon l'invention, capable de phosphoryler un analogue de nucleoside pour generer
25 un analogue monophosphate, est avantageusement une thymidine kinase non

mammifere. Il s'agit preferentiellement d'une thymidine kinase d'origine virale, et en particulier herpetique. Parmi les thymidine kinases herpetiques on peut mentionner notamment la thymidine kinase du virus de l'herpes simplex de type 1 (HSV1-TK), la thymidine kinase du virus de l'herpes simplex de type 2
5 (HSV2-TK), la thymidine kinase du virus de la varicelle (VZV-TK), la thymidine kinase du virus d'Eppstein Barr (EBV-TK), ou encore la thymidine kinase de virus herpetiques d'origine bovine (Mittal et al., J. Virol 70 (1989) 2901), equine Robertson et al., NAR 16 (1988) 11303), feline (Nunberg et al., J. Virol. 63 (1989) 3240) ou simienne (Otsuka et al., Virology 135 (1984) 316).

10 La séquence du gène codant pour l'enzyme thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1 a été décrite dans la littérature (voir notamment McKnight 1980 Nucl. Acids Res. 8 p5931). Il en existe des variants naturels conduisant à des protéines ayant une activité enzymatique comparable sur la thymidine, ou le ganciclovir (M. Michael et coll. 1995 Biochem. Biophys. Res.
15 Commun 209 p966). La séquence du gène codant pour l'enzyme thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 2 a également été décrite (Swain et al., J. Virol. 46 (1983) 1045).

La thymidine kinase utilisée dans la presente invention peut etre une thymidine kinase native (la forme naturelle de l'enzyme ou un de ses variants
20 naturels), ou une forme dérivée, c'est a dire resultant de modification(s) structurale(s) de la forme native. Comme indique ci-avant, differents mutants ou derives ont été decrits dans la litterature. Bien que leurs proprietes intrinseques ne semblent pas significativement modifiées, ces molecules peuvent etre utilisées dans le cadre de la presente invention. Il s'agit par exemple de mutants
25 possedant une modification proche de la region DRH du site d'interaction d'un nucleoside (WO95/30007). La region DRH correspond aux residus aspartique,

arginine et histidine aux positions 163, 164 et 165 de la TK. Ces trois positions sont tres conservées entre les TK herpetiques. Differents mutants ont été decrits sur les positions 160-162 et 168-170 (WO95/30007). D'autres variant artificiels possèdent une modification au niveau du site de liaison de l'ATP (FR96 01603).

5 Par ailleurs, d'autres derives de TK peuvent etre prepares selon les techniques classiques de la biologie moleculaire, et utilises dans les combinaisons de l'invention. Ces mutants peuvent etre prepares par exemple par mutagenese sur un acide nucleique codant pour une thymidine kinase native, de preference herpetique, ou un de ses variants. De nombreuses méthodes permettant de

10 réaliser la mutagénèse dirigée ou au hasard sont connues de l'homme de l'art et on peut citer la mutagénèse dirigée par PCR ou par oligonucléotide, la mutagénèse au hasard in vitro par des agents chimiques comme par exemple l'hydroylamine ou in vivo dans des souches de E. coli mutatrices (Miller "A short course in bacterial genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring

15 Harbor, N.Y., 1992). Les sequences ainsi mutées sont alors exprimées dans un systeme cellulaire ou acellulaire et le produit d'expression est teste pour la presence d'une activite de type thymidine kinase, dans les conditions decrites notamment dans les exemples. Toute enzyme resultant de ce procede, ayant la capacite de phosphoryler un analogue de nucleoside, pour generer un analogue

20 monophosphate, peut etre utilisée dans la presente invention.

Préférentiellement, on utilise dans le cadre de la presente invention une TK issue de la thymidine kinase du virus de l'herpes simplex de type 1 (HSV1-TK) ou un acide nucleique codant correspondant Il s'agit plus particulierement de la HSV1-TK ou un de ses variants, tels que les variants naturels ou les

25 variants artificiels. Parmi les variants artificiels, on peut citer plus particulierement les variants P155A/F161V et F161I (Biochemistry 32 (1993)

p.11618), le variant A168S (Prot. Engin. 7 (1994) p.83) ou les variants possédant une modification au niveau du site de liaison de l'ATP tel que le variant M60I. Encore plus préférentiellement, on utilise un acide nucléique codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpes simplex de type 1 (HSV1-TK).

- 5 La deuxième enzyme utilisée dans les compositions et méthodes selon l'invention, capable de phosphoryler un analogue de nucléoside monophosphate pour générer un analogue diphosphate, est avantageusement une guanylate kinase. La guanylate kinase (GMPK) a été purifiée à partir de différents organismes (homme, rat, boeuf, levure). Le gène codant pour la
- 10 GMPK a été cloné également dans différents types cellulaires, et notamment dans la levure Saccharomyces cerevisiae, gène GUK1 (M. Konrad 1992 J. Biol. Chem. 267 p25652). À partir de ce gène, l'enzyme GMPK de 20 kDa a également été purifiée. Le gène de la GMPK, désigné gmk, a également été isolé et surexprimé chez Escherichia coli (D. Gentry et coll. 1993 J. Biol. Chem. 268
- 15 p14316). Cette enzyme est différente de l'enzyme de S. cerevisiae en terme de coopérativité et d'oligomérisation, alors que les séquences présentent de fortes régions d'identité 46,2% sur 182 résidus. La séquence A11042, identifiée comme codant pour un facteur ayant une activité de potentialité de croissance de cellules hématopoïétiques (EP0274560), présente 51,9% d'identité sur 180 résidus
- 20 avec le gène GUK1 de S. cerevisiae, et semble constituer l'homologue humain de la GMPK, bien qu'aucune donnée biochimique n'ait été publiée.

- La troisième enzyme utilisée dans les compositions et méthodes selon l'invention, capable de phosphoryler un analogue de nucléoside diphosphate pour générer un analogue triphosphate, est avantageusement une nucléoside
- 25 diphosphate kinase. La nucléoside diphosphate kinase (NDPK) est une enzyme à large spécificité de substrat et a été purifiée à partir de sources très variées (M.

Inouye et coll. 1991 Gene 105 p31). Pour divers organismes (*Myxococcus xanthus*, *Drosophila melanogaster*, *Dictyostelium discoideum*, rat, boeuf, homme, *E. coli* et *S. cerevisiae*) le gène codant pour la NDPK a été cloné et les enzymes correspondantes sont très homologues (K. Watanabe et coll. 1993 Gene 29 p141). Néanmoins seules les enzymes des eucaryotes supérieurs possèdent une séquence "leucine zipper". Les gènes humains décrits codant pour une activité NDPK sont en particulier nm23-H1 et nm23-H2. Il est suggéré que le gène nm23-H2 code pour une protéine bifonctionnelle avec deux fonctions indépendantes qui sont activité NDPK et facteur de transcription (E. Postel et coll. 1994 J. Biol. Chem. 269 p8627). Le gène YNK de *S. cerevisiae* n'est pas un gène essentiel pour la levure et code pour la NDPK qui est probablement une protéine tétramérique dont le poids moléculaire des monomères est de 19 kDa (A. Jong et coll. 1991 Arch. Biochem. Biophys. 291 p241).

Les séquences nucléiques codant pour la GMPK ou la NDPK utilisées dans le cadre de l'invention peuvent être d'origine humaine, animale, virale, synthétique ou semi-synthétique.

D'une manière générale, les séquences nucléiques de l'invention peuvent être préparées selon toute technique connue de l'homme du métier. A titre illustratif de ces techniques on peut notamment mentionner:

- la synthèse chimique, en utilisant les séquences décrites dans la littérature et par exemple un synthétiseur d'acides nucléiques,
- le criblage de banques au moyen de sondes spécifiques, notamment telles que décrites dans la littérature, ou encore

- les techniques mixtes incluant la modification chimique (élongation, délétion, substitution, etc) de séquences criblées à partir de banques.

Avantageusement, les séquences nucléiques utilisées dans le cadre de l'invention sont des séquences d'ADNc ou d'ADNg. Les séquences d'ADNc sont des séquences dépourvues d'introns, obtenues à partir d'ARN. Les séquences d'ADNg sont des régions de chromosome. Chez les eucaryotes, elles comprennent un ou plusieurs introns. Les séquences d'ADNg utilisées dans le cadre de l'invention peuvent comprendre tout ou partie des introns présents dans le gène naturel, ou un ou plusieurs introns artificiellement introduits dans un ADNc pour augmenter par exemple l'efficacité d'expression dans les cellules mammifères. Les acides nucléiques peuvent coder pour les enzymes natives ou pour des variants ou dérivés présentant une activité de même type. Ces acides nucléiques analogues peuvent être obtenus par les techniques classiques de la biologie moléculaire, bien connues de l'homme du métier. Il peut s'agir de mutagenèse, dirigée ou non, d'hybridation à partir de banques, de délétion ou d'insertion, de la construction de molécules hybrides, etc. Généralement, les modifications portent sur moins de 20% des bases de l'acide nucléique. La fonctionnalité des acides nucléiques analogues est déterminée comme décrit dans les exemples par dosage de l'activité enzymatique du produit d'expression.

Une composition particulière au sens de l'invention comprend un premier acide nucléique codant pour une thymidine kinase et un second acide nucléique codant pour une nucléoside diphosphate kinase. Dans ce mode de réalisation, la nucléoside diphosphate kinase est préférentiellement d'origine eucaryote non-humaine. On entend par enzyme non-humaine une enzyme non présente naturellement dans les cellules humaines. Il peut s'agir d'une enzyme virale, animale, ou issue d'un organisme eucaryote inférieur (tel qu'une levure).

Il peut également s'agir d'un derive non naturel d'une enzyme humaine, presentant une ou plusieurs modifications structurales. Plus preferentiellement, elle la NDPK utilisée dans la presente invention est choisie parmi la NDPK de levure ou de boeuf. Ces compositions peuvent en outre comprendre un acide
5 nucleique codant pour une guanylate kinase, comme par exemple une guanylate kinase de levure.

Une autre composition particuliere au sens de l'invention comprend un premier acide nucleique codant pour une thymidine kinase et un second acide nucleique codant pour une guanylate kinase non humaine. La GMPK non-
10 humaine peut etre choisie parmi les GMPK de rat, de beouf, de levure, de bacterie, ou des derives de celles-ci. Preferentiellement, la GMPK est issue d'un eucaryote inferieur, notamment de levure.

Selon un mode de realisation particulierement avantageux, la nucléoside diphosphate kinase utilisée dans le cadre de la presente invention est d'origine
15 eucaryote ou animale. Encore plus preferentiellement, il s'agit d'une nucléoside diphosphate kinase de levure ou de boeuf. La demanderesse a en effet mis en évidence que, de maniere surprenante, la nucléoside diphosphate kinase de levure, et notamment de Saccharomyces cerevisae ou celle de boeuf, permettaient de phosphoryler des analogues de nucléosides diphosphates, tels
20 que le ganciclovir diphosphate ou l'acyclovir diphosphate, en nucléosides triphosphates. En outre, les resultats presentes dans les exemples montrent clairement que ces enzymes possèdent sur ces substrats une activité tres superieure a l'enzyme humaine. Ainsi, en presence de 0,675 µg d'enzyme humaine, le pourcentage de GCV triphosphate obtenu est de 1,5%, alors qu'en
25 presence de 0,75 µg d'enzyme de levure, il est de 82.9%. De meme, en presence de 6,75 µg d'enzyme humaine, le pourcentage de GCV triphosphate obtenu est

de 24%, alors qu'en presence de 1,5 µg d'enzyme de levure, il est de 91.1% et en presence de 5 µg d'enzyme de boeuf, il est de 92 %. Les memes resultats sont obtenus avec un autre analogue de nucleoside, l'acyclovir. Ainsi, en presence de 6,75 µg d'enzyme humaine, le pourcentage d'ACV triphosphate obtenu est inferieur a 0.4%, alors qu'en presence de 1,5 µg d'enzyme de levure, il est de 8%, en presence de 15 µg d'enzyme de levure, il est de 81% et en presence de 5 µg d'enzyme de boeuf, il est de 1.3%. Ces resultats mettent clairement en evidence l'avantage d'utiliser, dans les combinaisons selon l'invention, une nucléoside diphosphate kinase de levure ou de boeuf. Ces resultats montrent egalement que la premiere etape de phosphorylation de l'analogue en monophosphate n'est pas forcément l'etape limitante du processus et que l'utilisation d'une combinaison d'enzymes selon l'invention permet d'augmenter le potentiel therapeutique du traitement.

Par ailleurs, la demanderesse a egalement montre que la guanylate kinase de levure, et notamment de Saccharomyces cerevisiae, permettait egalement de phosphoryler des analogues de nucléosides monophosphates, tels que le ganciclovir monophosphate ou l'acyclovir monophosphate, en nucléosides diphosphates avec une bonne activite. Ainsi, en presence de 2,5 µg d'enzyme de levure, le pourcentage de GCV diphosphate obtenu peut depasser 92% et en presence de 74 µg d'enzyme de levure, le pourcentage d'ACV diphosphate obtenu est de 54%. De plus, les resultats presentes montrent que la guanylate kinase de levure presente une vitesse de phosphorylation du GCVMP 2 fois superieure a l'enzyme humaine. De meme, son affinite pour le GCVMP est superieure d'un facteur au moins egal a 2 a l'affinite que presente l'enzyme humaine pour ce substrat. Au total, la valeur du V_{max}/K_m de l'enzyme de levure pour le GCVMP est 4,4 fois superieure a la valeur que presente l'enzyme

humaine. Pour l'ACVMP, la valeur du V_{max}/K_m de l'enzyme de levure est 7 à 9 fois supérieure à la valeur que présente l'enzyme humaine pour ce substrat.

La demanderesse a aussi mis en évidence qu'un couplage de ces deux enzymes non-humaines avec une thymidine kinase, par exemple la thymidine kinase du virus de herpès de type I permettait de phosphoryler des analogues de nucléosides tels que le ganciclovir ou l'acyclovir en dérivés triphosphates, avec une efficacité très importante.

Selon un mode de réalisation préféré, les compositions de l'invention comprennent des séquences codant pour la guanylate kinase (EC-2.7.4.8) et/ou la nucléoside diphosphate kinase (EC-2.7.4.6) de levure. Plus préférentiellement, il s'agit des enzymes de la levure *S. cerevisiae*. Ces séquences sont utilisées simultanément avec une séquence (HSV1-TK) codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1 (EC-2.7.1.21) pour permettre de triphosphoryler les analogues de nucléosides tels que le ganciclovir ou l'acyclovir.

Comme indique ci-avant, les compositions selon l'invention peuvent comprendre une combinaison d'enzymes ou d'acides nucléiques permettant la production in vivo des enzymes. Il s'agit avantageusement d'acides nucléiques. Ce mode de mise en œuvre est préféré puisqu'il permet une production in vivo de niveaux supérieurs d'enzymes et ainsi un effet thérapeutique plus important.

Selon un premier mode de réalisation, dans les compositions de l'invention, les acides nucléiques sont portés par un même vecteur d'expression. Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux car il suffit d'introduire un seul vecteur dans une cellule mammifère pour obtenir l'effet thérapeutique recherché. Dans ce mode de réalisation, les différents acides nucléiques peuvent

constituer trois cassettes d'expression distinctes au sein du même vecteur d'expression. Ainsi, les différents acides nucléiques peuvent chacun être placés sous le contrôle d'un promoteur transcriptionnel, d'un terminateur transcriptionnel et de signaux de traduction distincts. Il est également possible d'insérer plusieurs acides nucléiques sous forme d'un polycistron dont l'expression est dirigée par un seul promoteur et un seul terminateur transcriptionnels. Ceci peut être réalisé notamment par l'utilisation de séquences IRES ("Internal Ribosome Entry Site") positionnées entre les séquences nucléiques. A cet égard, les vecteurs d'expression de l'invention peuvent comprendre une unité bicistronique dirigeant l'expression de deux acides nucléiques, et éventuellement un acide nucléique séparé codant pour la troisième enzyme. Les vecteurs de l'invention peuvent également comprendre une unité tricistronique dirigeant l'expression des trois acides nucléiques. Ces différents modes de réalisation sont illustrés dans les exemples.

Des vecteurs d'expression préférés au sens de l'invention sont notamment:

- Un vecteur comprenant:

- . un premier acide nucléique codant pour une thymidine kinase, et,
- . un deuxième acide nucléique codant pour une guanylate kinase non-humaine. Il s'agit préférentiellement d'une guanylate kinase de levure.

- Un vecteur comprenant:

- . un premier acide nucléique codant pour une thymidine kinase, et,
- . un deuxième acide nucléique codant pour une nucléoside diphosphate kinase. Il s'agit préférentiellement d'une nucléoside diphosphate kinase

eucaryote non-humaine. Plus préférentielement, il s'agit d'une NDPK d'origine bovine ou levure.

Avantageusement, ce vecteur comprend en outre un acide nucléique codant pour une guanylate kinase.

- 5 La thymidine kinase utilisée dans les vecteurs de l'invention est avantageusement une thymidine kinase d'origine virale, notamment herpétique. Il s'agit préférentiellement d'une thymidine kinase issue de la TK du virus HSV-1 ou HSV-2.

- 10 Comme indique ci-avant, dans les vecteurs selon l'invention, les différents acides nucléiques peuvent être placés sous le contrôle de promoteurs distincts, ou constituer une unité polycistronique sous le contrôle d'un promoteur unique. A cet égard, comme indiqué ci-avant, les enzymes peuvent également être produites sous forme couplées, les différents acides nucléiques étant couplés pour produire une protéine portant les différentes activités enzymatiques. En
- 15 particulier, un mode de réalisation particulier des vecteurs selon l'invention est caractérisé en ce que l'acide nucléique codant pour la thymidine kinase d'origine virale et l'acide nucléique codant pour la guanylate kinase non-humaine sont couplés et codent pour une protéine portant à la fois les activités TK et GUK. Selon une autre variante, dans les vecteurs de l'invention, l'acide nucléique
- 20 codant pour la thymidine kinase d'origine virale et l'acide nucléique codant pour la nucléoside diphosphate kinase sont couplés et codent pour une protéine portant à la fois les activités TK et NDPK. A titre illustratif, le couplage entre les enzymes est réalisé au moyen d'un linker peptidique, par exemple de structure $(G_4S)_n$.

Selon un autre mode de réalisation, dans la composition de l'invention, les acides nucléiques sont portés par plusieurs vecteurs d'expression.

Comme indique ci-après, les vecteurs d'expression peuvent être d'origine plasmidique ou virale. S'agissant de vecteurs d'origine virale, il s'agit
5 avantageusement de retrovirus ou d'adenovirus.

Différents promoteurs peuvent être utilisés dans le cadre de l'invention. Il s'agit de séquences permettant l'expression d'un acide nucléique dans une cellule mammifère. Le promoteur est avantageusement choisi parmi les promoteurs fonctionnels dans les cellules humaines. Plus préférentiellement, il s'agit d'un
10 promoteur permettant l'expression d'une séquence d'acide nucléique dans une cellule hyperproliférative (cancéreuse, resténose, etc). A cet égard, différents promoteurs peuvent être utilisés. Il peut s'agir par exemple du propre promoteur du gène considéré (TK, GMPK, NDPK). Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou
15 même synthétiques). Il peut ainsi s'agir de tout promoteur ou séquence dérivée stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non, inductible ou non, forte ou faible. On peut citer notamment les séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule cible. Parmi les
20 promoteurs eucaryotes, on peut utiliser en particulier de promoteurs ubiquitaires (promoteur des gènes HPRT, PGK, α -actine, tubuline, DHFR etc), de promoteurs des filaments intermédiaires (promoteur des gènes GFAP, desmine, vimentine, neurofilaments, kératine, etc), de promoteurs de gènes thérapeutiques (par exemple le promoteur des gènes MDR, CFTR, Facteur VIII, ApoAI, etc), de promoteurs spécifiques de tissus (promoteur du gène pyruvate
25 kinase, villine, protéine intestinale de liaison des acides gras, α -actine du

- muscle lisse, etc), des promoteurs cellules spécifiques de type cellules en division comme les cellules cancéreuses ou encore de promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, récepteur de glucocorticoïdes, etc) ou dits inductibles. De même, il peut s'agir de
- 5 séquences promotrices issues du génome d'un virus, tel que par exemple les promoteurs des gènes E1A et MLP d'adénovirus, le promoteur précoce du CMV, ou encore le promoteur du LTR du RSV, etc. En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire.
- 10 Un autre objet de l'invention concerne un produit comprenant une combinaison d'enzymes capables de triphosphoryler un analogue de guanosine, et ledit analogue de guanosine, en vue d'une administration simultanée, séparée, ou étalée dans le temps.

L'invention concerne également une composition pour la production in vivo

15 d'un analogue de nucleoside triphosphate toxique comprenant, conditionnes separement ou ensemble :

- un analogue de nucleoside
- un acide nucleique codant pour une thymidine kinase
- un acide nucleique codant pour une guanylate kinase, et,
- 20 - un acide nucleique codant pour une nucléoside diphosphate kinase.

L'invention a encore pour objet une composition comprenant une combinaison d'enzymes impliquées dans la phosphorylation de nucleosides, eventuellement generées in situ par expression de sequences nucleiques, l'une au moins de ces enzymes etant d'origine eucaryote non-humaine. La combinaison d'enzyme

comprend notamment une TK et une NDPK; une TK et une GMPK ou une TK, une GMPK et une NDPK.

La presente invention concerne encore une methode pour la destruction de cellules proliferatives comprenant l'administration auxdites cellules d'une
5 combinaison d'enzymes comprenant une TK et une NDPK. Preferentiellement, la combinaison comprend en outre une guanylate kinase. L'invention concerne egalement une methode pour la destruction de cellules proliferatives comprenant l'administration auxdites cellules d'une combinaison d'enzymes comprenant une TK et une GMPK.

10 Selon cette methode, les cellules sont mises en contact avec un analogue de nucleoside, de preference un analogue de guanosine, qui est converti dans les cellules exprimant la combinaison d'enzymes en un compose toxique.

Selon l'invention, les enzymes peuvent etre administrees aux cellules par administration d'acides nucleiques codant pour lesdites enzymes.

15 L'invention reside egalement dans l'utilisation de la nucléoside diphosphate kinase ou d'un acide nucleique codant pour celle-ci, en combinaison avec une thymidine kinase ou un acide nucleique codant pour une thymidine kinase, pour la preparation d'une composition pharmaceutique destinee a la destruction des cellules proliferatives.

20 L'invention concerne encore un procede de triphosphorylation d'un analogue de nucleoside comprenant la mise en presence dudit analogue avec une combinaison d'enzymes, l'une au moins d'entre elles etant d'origine eucaryote non-humaine.

La présente invention fournit maintenant de nouveaux agents thérapeutiques permettant d'interférer avec de nombreux dysfonctionnements cellulaires. Dans ce but, les acides nucléiques ou cassettes selon l'invention peuvent être injectés tels quels au niveau du site à traiter, ou incubés directement avec les cellules à détruire ou traiter. Il a en effet été décrit que les acides nucléiques nus pouvaient pénétrer dans les cellules sans vecteur particulier. Néanmoins, on préfère dans le cadre de la présente invention utiliser un vecteur d'administration, permettant d'améliorer (i) l'efficacité de la pénétration cellulaire, (ii) le ciblage (iii) la stabilité extra- et intracellulaires. Dans un mode de mise en oeuvre particulièrement préféré de la présente invention, les séquences nucléiques sont incorporées dans un vecteur de transfert. Le vecteur utilisé peut être d'origine chimique, plasmidique ou virale.

Par vecteur chimique, on entend couvrir au sens de l'invention, tout agent non viral capable de promouvoir le transfert et l'expression de séquences nucléiques dans des cellules eucaryotes. Ces vecteurs chimiques ou biochimiques, synthétiques ou naturels, représentent une alternative intéressante aux virus naturels en particulier pour des raisons de commodité, de sécurité et également par l'absence de limite théorique en ce qui concerne la taille de l'ADN à transférer. Ces vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, compacter l'acide nucléique à transférer et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, les deux membranes nucléaires. Pour pallier à la nature polyanionique des acides nucléiques, les vecteurs non viraux possèdent tous des charges polycationiques. A titre représentatif de ce type de techniques de transfection non virales, actuellement développées pour l'introduction d'une information génétique, on peut ainsi mentionner celles impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran

(Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc.

5 L'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

10 L'acide nucléique ou le vecteur utilisé dans la présente invention peut être formulé en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, la séquence nucléique ou le vecteur est utilisé sous une forme injectable. Il peut donc être mélangé à tout véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe
15 au niveau du site à traiter. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Une injection directe de la séquence d'acides nucléiques dans la tumeur du patient est intéressante car elle permet de concentrer l'effet
20 thérapeutique au niveau des tissus affectés. Les doses en séquences nucléiques utilisées peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du vecteur, du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée.

L'invention concerne également toute composition pharmaceutique
25 comprenant une combinaison d'enzymes telle que définie ci-avant.

Elle concerne également toute composition pharmaceutique comprenant au moins un vecteur tel que défini ci-avant.

Elle concerne aussi l'utilisation d'une NDPK d'origine levure ou d'une GMPK d'origine levure pour la phosphorylation in vivo d'analogues de
5 nucleosides.

En raison de leurs propriétés antiprolifératives, les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont tout particulièrement adaptées pour le traitement des désordres hyperprolifératifs, tels que notamment les cancers et la resténose. La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement
10 efficace pour la destruction de cellules, notamment de cellules hyperprolifératives. Elle est ainsi applicable à la destruction des cellules tumorales ou des cellules de muscle lisse de la paroi vasculaire (resténose). Elle est tout particulièrement appropriée au traitement des cancers. A titre d'exemple, on peut citer les adénocarcinomes du colon, les cancers de la thyroïde, les carcinomes du poumon,
15 les leucémies myéloïdes, les cancers colorectaux, les cancers du sein, les cancers du poumon, les cancers gastriques, les cancers de l'oesophage, les lymphômes B, les cancers ovariens, les cancers de la vessie, les glioblastomes, les hépatocarcinomes, les cancers des os, de la peau, du pancréas ou encore les cancers du rein et de la prostate, les cancers de l'oesophage, les cancers du larynx,
20 les cancers tête et cou, les cancers ano-génitaux HPV positifs, les cancers du nasopharynx EBV positifs, etc.

Elle peut être utilisée in vitro ou ex vivo. Ex vivo, elle consiste essentiellement à incuber les cellules en présence d'une séquence nucléique (ou d'un vecteur, ou cassette ou directement du dérivé). In vivo, elle consiste à
25 administrer à l'organisme une quantité active d'un vecteur (ou d'une cassette)

selon l'invention, de préférence directement au niveau du site à traiter (tumeur notamment), préalablement, simultanément et/ou après l'injection de la prodrogue considérée c'est à dire le ganciclovir ou un analogue nucléoside. A cet égard, l'invention a également pour objet une méthode de destruction de cellules hyperprolifératives comprenant la mise en contact desdites cellules ou d'une partie d'entre-elles avec une combinaison d'enzymes ou de séquences nucléiques telles que définies ci-avant, en présence d'un analogue de nucleoside.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples et figures qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDE DES FIGURES:

Figure 1 : Représentation schématique du vecteur pcDNA3-TK

Figure 2 : Représentation schématique du vecteur pXL2854

Figure 3 : Représentation schématique du vecteur pXL2967

Figure 4 : Représentation schématique du vecteur pXL3081

Figure 5 : Mise en évidence de l'expression des protéines GMPK et NDPK

Figure 6 : Représentation schématique du vecteur pXL3098

Tableau 1 : Constantes cinétiques des GMPK de levure et d'érythrocytes humaine sur le GCVMP et l'ACVMP. Valeurs publiées: [D.F.Smée *et al.* (1985)

Biochem.Pharmacol. 34:1049-1056] ^a ; [R. E. Boehme (1984) *J. Biol. Chem.* 259:12346-12349] ^b; [W. H. Miller and R. L. Miller (1980) *J. Biol. Chem.* 255:7204-7207] ^c

Tableau 2 : Couplage TK-GMPK-NDPK : % des produits formes

MATERIELS ET METHODES

Abréviations

ACV : acyclovir

5 GCV : ganciclovir

GMPK : guanylate kinase

HSV1-TK : thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1.

NDPK : nucléoside diphosphate kinase

Techniques générales de biologie moléculaire

10 Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de
15 l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans Escherichia coli sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature (Sambrook et coll. "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel et coll. "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987).

Les plasmides de type pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories), les plasmides pBSK ou pBKS proviennent de Stratagen.

5 L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymerase-catalyzed Chain Reaction] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les recommandations du fabricant.

10 L'électroporation d'ADN plasmidique dans des cellules de E. coli peut-être réalisée à l'aide d'un électroporateur (Bio-Rad) selon les recommandations du fournisseur.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham ou celui distribué par Applied Biosystems.

15 **EXEMPLE 1** - Construction des vecteurs d'expression des combinaisons d'enzymes

Cet exemple décrit différentes méthodes pour la construction de vecteurs d'expression et de transfert des séquences nucléiques de l'invention in vitro ou in vivo.

20 **1.1 - Construction de vecteurs plasmidiques**

Pour la construction de vecteurs plasmidiques, différents types de vecteurs d'expression peuvent être utilisés. 2 types de vecteurs sont plus particulièrement préférés :

- Le vecteur pSV2, décrit dans DNA Cloning, A practical approach Vol.2, D.M. Glover (Ed) IRL Press, Oxford, Washington DC, 1985. Ce vecteur est un vecteur d'expression eucaryote. Les acides nucléiques codant pour les combinaisons d'enzymes de l'invention peuvent être insérés dans ce vecteur aux sites HpaI-EcoRV. Ils sont ainsi placés sous le contrôle du promoteur de l'enhancer du virus SV40.

- Le vecteur pCDNA3 (Invitrogen). Il s'agit également d'un vecteur d'expression eucaryote. Les séquences nucléiques codant pour les enzymes ou les combinaisons d'enzymes de l'invention sont placées, dans ce vecteur, sous le contrôle du promoteur précoce du CMV.

1.2 - Construction de vecteurs viraux

Selon un mode particulier, l'invention réside dans la construction et l'utilisation de vecteurs viraux permettant le transfert et l'expression in vivo des acides nucléiques tels que définis ci-avant.

S'agissant plus particulièrement d'adénovirus, différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, ont été caractérisés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2. [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et un acide nucléique selon l'invention. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, la région E1 au moins est non fonctionnelle. Le gène viral considéré peut être rendu non
5 fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes. D'autres
10 régions peuvent également être modifiées, et notamment la région E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) et L5 (WO95/02697). Selon un mode préféré de mise en oeuvre, l'adénovirus selon l'invention comprend une délétion dans les régions E1 et E4. Selon un autre mode de réalisation préféré, il comprend une délétion dans région E1 au niveau de
15 laquelle sont insérés la région E4 et la séquence nucléique de l'invention (Cf FR94 13355). Dans les virus de l'invention, la délétion dans la région E1 s'étend préférentiellement des nucléotides 455 à 3329 sur la séquence de l'adénovirus Ad5.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195,
20 EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre une séquence nucléique ou une combinaison de séquences nucléiques de l'invention. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire
25 utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de

l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un
5 adénovirus Ad5 (12 %) ou des lignées capables de compléter les fonctions E1 et E4 telles que décrites notamment dans les demandes n° WO 94/26914 et WO95/02697 ou dans Yeh et al., J. Virol. 70 (1996) 559.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

10 Concernant les virus adéno-associés (AAV), il s'agit de virus à ADN de taille relativement réduite, qui s'intègrent dans le génome des cellules qu'ils infectent, de manière stable et site-spécifique. Ils sont capables d'infecter un large spectre de cellules, sans induire d'effet sur la croissance, la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par ailleurs, ils ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez
15 l'homme. Le génome des AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à chaque extrémité une région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant d'origine de réplication pour le virus. Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient le gène rep impliqué dans la réplication
20 virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus.

L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Ces demandes décrivent différentes
25 constructions dérivées des AAV, dans lesquelles les gènes rep et/ou cap sont

délétés et remplacés par un gène d'intérêt, et leur utilisation pour transférer in vitro (sur cellules en culture) ou in vivo (directement dans un organisme) ledit gène d'intérêt. Les AAV recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par co-transfection, dans un lignée cellulaire infectée par un virus auxiliaire humain (par exemple un adénovirus), d'un plasmide contenant une séquence nucléique ou une combinaison de séquences nucléiques de l'invention bordée de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV, et d'un plasmide portant les gènes d'encapsulation (gènes rep et cap) d'AAV. Une lignée cellulaire utilisable est par exemple la lignée 293. D'autres systèmes de production sont décrits par exemple dans les demandes WO95/14771; WO95/13365; WO95/13392 ou WO95/06743. Les AAV recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Concernant les virus de l'herpès et les rétrovirus, la construction de vecteurs recombinants a été largement décrite dans la littérature : voir notamment Breakfield et al., New Biologist 3 (1991) 203; EP 453242, EP178220, Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689, etc. En particulier, les rétrovirus sont des virus intégratifs, infectant sélectivement les cellules en division. Ils constituent donc des vecteurs d'intérêt pour des applications cancer. Le génome des rétrovirus comprend essentiellement deux LTR, une séquence d'encapsulation et trois régions codantes (gag, pol et env). Dans les vecteurs recombinants dérivés des rétrovirus, les gènes gag, pol et env sont généralement délétés, en tout ou en partie, et remplacés par une séquence d'acide nucléique hétérologue d'intérêt. Ces vecteurs peuvent être réalisés à partir de différents types de rétrovirus tels que notamment le MoMuLV ("murine Moloney leukemia virus"; encore désigné MoMLV), le MSV ("murine Moloney sarcoma virus"), le HaSV ("Harvey sarcoma virus"); le SNV ("spléen necrosis virus"); le RSV ("Rous sarcoma virus") ou encore le virus de Friend.

- Pour construire des rétrovirus recombinants selon l'invention comportant une séquence nucléique ou une combinaison de séquences nucléiques selon l'invention, un plasmide comportant notamment les LTR, la séquence d'encapsidation et ladite séquence nucléique est construit, puis utilisé pour
- 5 transférer une lignée cellulaire dite d'encapsidation, capable d'apporter en trans les fonctions rétrovirales déficientes dans le plasmide. Généralement, les lignées d'encapsidation sont donc capables d'exprimer les gènes gag, pol et env. De telles lignées d'encapsidation ont été décrites dans l'art antérieur, et notamment la lignée PA317 (US4,861,719); la lignée PsiCRIP (WO90/02806) et la lignée GP+envAm-12
- 10 (WO89/07150). Par ailleurs, les rétrovirus recombinants peuvent comporter des modifications au niveau des LTR pour supprimer l'activité transcriptionnelle, ainsi que des séquences d'encapsidation étendues, comportant une partie du gène gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). Les rétrovirus recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.
- 15 Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un adénovirus ou un rétrovirus recombinant défectif. Ces vecteurs possèdent en effet des propriétés particulièrement intéressantes pour le transfert de gènes suicides dans les cellules tumorales.

1.3 - Vecteurs chimiques

- 20 Les acides nucléiques ou les vecteurs d'expression plasmidiques décrits dans cet exemple (1.1) et dans l'exemple 2 peuvent être administrés tels quels in vivo ou ex vivo. Il a en effet été montré que les acides nucléiques nus pouvaient transférer les cellules. Cependant, pour améliorer l'efficacité de transfert, on préfère utiliser dans le cadre de l'invention un vecteur de transfert. Il peut s'agir d'un vecteur viral
- 25 (exemple 1.2.) ou d'un agent de transfection synthétique.

Parmi les vecteurs synthétiques développés, on préfère utiliser dans le cadre de l'invention les polymères cationiques de type polylysine, (LKLK)_n, (LKKL)_n, (PCT/FR/00098) polyéthylène imine (WO96/02655) et DEAE dextran ou encore les lipides cationiques ou lipofectants. Ils possèdent la propriété de condenser l'ADN et de promouvoir son association avec la membrane cellulaire. Parmi ces derniers, on peut citer les lipopolyamines (lipofectamine, transfectam, etc) différents lipides cationiques ou neutres (DOTMA, DOGS, DOPE, etc) ainsi que des peptides d'origine nucléaire. En outre, le concept de la transfection ciblée a été développé, médiée par un récepteur, qui met à profit le principe de condenser l'ADN grâce au polymère cationique tout en dirigeant la fixation du complexe à la membrane grâce à un couplage chimique entre le polymère cationique et le ligand d'un récepteur membranaire, présent à la surface du type cellulaire que l'on veut greffer. Le ciblage du récepteur à la transferrine, à l'insuline ou du récepteur des asialoglycoprotéines des hépatocytes a ainsi été décrit. La préparation d'une composition selon l'invention utilisant un tel vecteur chimique est réalisée selon toute technique connue de l'homme du métier, généralement par simple mise en contact des différents composants.

EXEMPLE 2 - Clonage de HSV1-TK et/ou de la guanylate kinase et/ou de la nucléoside diphosphokinase dans un vecteur d'expression eucaryote

Cet exemple décrit un mode particulier de réalisation de l'invention, utilisant un système de vecteur d'expression plasmidique pour produire in situ les combinaisons d'enzymes de l'invention.

L'expression de gènes procaryotes ou eucaryotes dans les cellules mammifères est connue de l'homme du métier. Pour optimiser cette expression, les vecteurs de l'invention décrit ci-après comportent les signaux suivants : i) un

promoteur/enhanceur tel que le promoteur CMV qui est bien exprimé dans les cellules humaines; ii) une séquence de Kozak, dont le consensus est (G/A)NNAUG(G/A); iii) le gène à exprimer; suivi iv) d'une séquence de polyadénylation (V. Chisholm 1995 DNA cloning Vol.4, ed. D. Glover et B. Hames p1). De telles constructions sont possibles à l'aide de vecteurs commerciaux tels que les vecteurs pZeoSV, pcDNA3... et ont été réalisées avec les gènes codant pour HSV1-TK, GMPK et NDK de S. cerevisiae.

2.1 - Vecteur d'expression de HSV1-TK

Le gène HSV1-TK codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1, issu du plasmide pHSV-106 (Gibco-BRL) a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 (Invitrogen). Ce plasmide pcDNA3-TK de 6936 bp a été construit en introduisant l'insert EcoRI-NotI de 1,5 kb provenant de pBTK1 entre les sites EcoRI et NotI du pcDNA3, voir figure1. Le plasmide pBTK1 a été obtenue de la manière suivante : Après avoir rendu les extrémités franches, l'insert BglII-NcoI de 1,5 kb provenant de pHSV-106 et contenant le gène HSV1-TK, dont la séquence est publiée par McKnight 1980 Nucl. Acids Res. 8 p5931, a été cloné au site SmaI du pBSK.

L'insert du plasmide pcDNA3-TK contient i) 60 bp en amont du gène HSV1-TK comprenant la séquence Kozak (CGTATGG), ii) la séquence du gène (1,13 kb) qui est identique à celle publiée par McKnight 1980 Nucl. Acids Res. 8 p5931, iii) la séquence 3' au gène (0,3 kb) qui est décrite aussi par McKnight.

2.2 - Vecteur d'expression de la guanylate kinase

Le gène GUK1 de 561 pb codant pour la guanylate kinase de S. cerevisiae issu de pGUK-1 (voir exemple 3), a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote

pcDNA3 (Invitrogen) après avoir introduit un consensus Kozak. Ce plasmide pXL2854 a été obtenu de la façon suivante. L'insert XbaI-BamHI du pGUK-1 contenant le gène GUK1 a été cloné dans le plasmide pSL301 (Invitrogen) entre les sites XbaI-BamHI de telle sorte que le gène GUK1 peut alors être excisé par les enzymes HindIII et BamHI et être cloné entre les sites HindIII et BamHI du pcDNA3 pour générer un plasmide pcDNA3-GUK1. Entre les sites HindIII et PflMI de ce plasmide est cloné un fragment HindIII-PflMI de 150 bp contenant un consensus Kozak et la région 5' de GUK1 pour former le plasmide pXL2854 de 6001 pb voir figure 2. Le fragment HindIII-PflMI de 150 bp a été isolé à partir d'un fragment de 280 bp amplifié par PCR à l'aide du plasmide pGUK-1 et des oligonucléotides sens 6915 5'(GAG AAG CTT GCC ATG GCC CGT CCT ATC GTA A)3' (SEQ ID n. 1) et antisens 6916 5'(GAG GAT CCG TTT GAC GGA AGC GAC AGT A)3' (SEQ ID n.2), l'hybridation ayant lieu à 45°C (le consensus Kozak étant souligné sur l'oligonucléotide 6915). La séquence nucléique amplifiée par PCR a été séquencée et présente deux différences par rapport à la séquence publiée (M. Konrad 1992 J. Biol. Chem. 267 p25652) correspondant aux changements S2A (Serine en position 2 remplacée par une alanine) et V34A (Valine en position 34 remplacée par une alanine).

2.3 - Vecteur d'expression de la nucléoside diphosphokinase

Le gène YNK codant pour la nucléoside diphosphokinase de S. cerevisiae, issu du plasmide pAD1-YNK (K. Watanabe et coll. 1993 Gene 29 p141), a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 (Invitrogen) après avoir introduit un consensus Kozak. Ce plasmide pXL2967 a été obtenu de la façon suivante. Une amplification par PCR a été effectuée avec le plasmide pAD1-YNK pour matrice et les oligonucléotides sens 7017 5'(AAG GAT CCA CCA TGG CTA GTC AAA CAG AAA)3' (SEQ ID n. 3.) et antisens 7038 5' (AAG AAT TCA GAT CTT CAT TCA TAA

ATC CA)3' (SEQ ID n. 4) à la température d'hybridation de 40°C (le consensus Kozak étant souligné sur l'oligonucléotide 7017). Le fragment amplifié de 477 bp est digéré par BamHI et EcoRI puis cloné entre les sites BamHI et EcoRI du pcDNA3 pour générer le plasmide pXL2967 de 5861 pb, voir figure 3. La séquence du
5 fragment amplifié par PCR est la même que celle publiée pour le gène YNK sauf à la position 4 ce qui correspond à un changement S2A S2A (Serine en position 2 remplacée par une alanine) pour la protéine NDPK (K. Watanabe et coll. 1993 Gene 29 p141).

2.4 - Vecteur pour la co-expression de 2 genes

10 La coexpression de genes peut etre realisée de plusieurs facons connues de l'homme du metier. Une mode de mise en oeuvre prefere consiste a introduire, entre les sequences a exprimer, des sites internes d'entrée des ribosomes, sequences IRES (Mountford et al., TIG 11 (1995) 179).

Une séquence IRES et le gène YNK sont introduits en 3' du gène GUK1 cloné
15 dans pcDNA3 pour generer un vecteur permettant la co-expression de GUK1 et YNK, sous forme d'une unite bicistronique (vecteur pGUK1-YNK). Plus précisément, la séquence de l'IRES (internal ribosome entry site) de l'EMCV (encephalomyocartis virus) provenant du plasmide pCITE (Novagen) a été reclonee par PCR entre des sites EcoRI et NcoI et introduite aux sites EcoRI et
20 EcoRV du plasmide pBluescript (Stratagene) pour générer le plasmide pXL3065. Le fragment NcoI-EcoRV de 477 bp contenant le gène YNK issu du plasmide pXL2967 est cloné entre les sites NcoI et EcoRV du pXL3065 pour former le plasmide pXL3079. Le fragment BamHI-EcoRV de 1 kb contenant l'IRES et le gène YNK du plasmide pXL3079 est alors cloné entre les sites BamHI et EcoRV
25 du plasmide pXL2854 pour générer le plasmide pXL3081. Ce plasmide contient les promoteurs CMV et T7 en amont du gène GUK1 codant pour la guanylate

- kinase de *S. cerevisiae* lui même suivi par l'IRES et le gène YNK codant pour la nucléoside diphosphokinase de *S. cerevisiae* voir figure 4. L'expression des protéines GMPK et NDPK a été testée à l'aide des plasmides pXL2854, pXL2967 et pXL3081 dans un système de transcription/traduction de réticulocytes
- 5 provenant de Promega, voir figure 5 . Les résultats obtenus montrent que les protéines GMPK et NDPK sont coexprimées avec le plasmide pXL3081.

La même approche est utilisée pour générer un vecteur coexprimant la TK et la YNK (vecteur pTK-YNK). ou la TK et la GUK1 (vecteur pTK-GUK1).

2.5 - Vecteur pour la co-expression de 3 gènes

- 10 La séquence codant pour la TK est insérée dans le vecteur pGUK1-YNK de l'exemple 2.4 ci-dessus pour générer un vecteur capable d'exprimer les 3 activités enzymatiques (vecteur pTK-GUK1-YNK).

2.6 - Vecteur pour l'expression d'une fusion HSV1-TK/*S.cerevisiae* GMPK

- 15 La construction de protéine fusion est bien connue de l'homme de l'art et se réalise par la création d'un linker peptidique entre la partie C-terminale d'une protéine et la partie N-terminale de l'autre protéine (1989 Nature 339 p394). Une telle protéine permet la co-localisation cellulaire des enzymes et peut aussi favoriser le "tunnelage" de substrat (Ljungcrantz et coll. 1989 Biochemistry 28 p8786).

- 20 Une protéine fusion a été réalisée en reliant à l'aide du linker -(Gly)₄-Ser-(Gly)₄-Ser-(Gly)₄ (SEQ ID n° 9) la séquence C-terminale de la HSV1-TK (Asn376) et la séquence N-terminale de la GMPK de *S. cerevisiae* (Ser2). Le plasmide pXL3098 permettant la production de cette protéine fusion a été construit de la façon suivante. La séquence 3' du gène HSV1-TK (positions 1108

à 1128) a été clonée par hybridation des oligonucléotides sens 5'(CCG GGA GAT GGG GGA GGC TAA CGG AGG TGG CGG TTC TGG TGG CGG AGG CTC CG)3' (SEQ ID n° 5) et antisens 5'(GAT CCG GAG CCT CCG CCA CCA GAA CCG CCA CCT CCG TTA GCC TCC CCC ATC TC)3' (SEQ ID n° 6), de telle sorte que le codon Asn du gène HSV1-TK (position 1128 bp) est suivi des codons codant pour les acides aminés ((Gly)₄Ser)₂Gly. Le fragment de 58 bp est ainsi cloné entre les sites XmaI et BamHI du pNEB193 (Biolabs) pour générer le plasmide pTKL+. La séquence 5' du gène GUK1 de S. cerevisiae est amplifiée par PCR à l'aide de la matrice pXL2854 et des oligonucléotides sens 5'(GAG AAT TCC GGA GGC GGT GGC TCC CGT CCT ATC GTA)3' (SEQ ID n° 7) et antisens 5'(GAG GAT CCG TTT GAC GGA AGC GAC AGT A)3' (SEQ ID n° 8), de telle sorte que le codon Ser à la position 2 de la GMPK est précédé des codons (Gly)₃Ser. Ce fragment de 0,27 kb est cloné entre les sites BamHI et EcoRI du pUC19 (Biolabs) pour former un plasmide qui est alors coupé par PflMI et BamHI afin d'y introduire le fragment PflMI-BamHI de 0,44 kb du pXL2854 contenant la séquence 3' de GUK1, et générer le plasmide pGUKL-. Le fragment BspEI-XbaI de 0,58 kb du pGUKL- est inséré entre les sites BspEI et XbaI du pTKL+ pour créer pTKLGUK. L'insert XmaI-BamHI de 0,63 kb du pTKLGUK est alors cloné entre les sites XmaI et BamHI du vecteur d'expression pET11a, pour former le plasmide pXL3098, voir figure 6. Ce plasmide est alors introduit dans la souche BL21DE3met- et conduit à la production de la protéine TK-((Gly)₄Ser)₃-GMPK.

La protéine fusion est alors purifiée jusqu'à homogénéité et les paramètres cinétiques de phosphorylation du GCV et de l'ACV de cette enzyme sont comparés aux paramètres cinétiques obtenus avec les protéines HSV1-TK et GMPK de S. cerevisiae.

2.7 - Transfert et expression in vivo

Les vecteurs decrits dans les exemples 2.1 a 2.6 sont utilisés pour le transfert et l'expression in vivo de combinaisons d'enzymes selon l'invention. Dans ce but, differentes compositions comprenant lesdits vecteurs sont préparées :

- 5 - une composition comprenant le vecteur pcDNA3-TK, le vecteur pXL2854 et la Lipofectamine,
- une composition comprenant le vecteur pcDNA3-TK, le vecteur pXL2967 et la Lipofectamine,
- une composition comprenant le vecteur pcDNA3-TK, le vecteur pXL2854, le
10 vecteur pXL2967 et la Lipofectamine
- une composition comprenant le vecteur pTK-GUK1 et la Lipofectamine, eventuellement en combinaison avec le vecteur pXL2967,
- une composition comprenant le vecteur pTK-YNK et la Lipofectamine, eventuellement en combinaison avec le vecteur pXL2854, et,
- 15 - une composition comprenant le vecteur pTK-GUK1-YNK et la Lipofectamine

La Lipofectamine peut etre remplacée par un autre vecteur chimique tel que decrit dans l'exemple 1.3.

- Ces differentes compositions sont utilisées in vivo ou ex vivo pour le transfert et l'expression intracellulaires de combinaisons d'enzymes selon l'invention. Elles
20 peuvent egalement etre utilisées sur cultures cellulaires, et par exemple sur cultures de cellules de fibroblastes NIH3T3 ou de cellules de carcinome humain du colon,

HCT116. Après transfert des vecteurs, l'analogue de nucleoside est administre et la destruction cellulaire est mise en evidence.

EXEMPLE 3 - Purification de la guanylate kinase

Les extraits acellulaires des souches de E. coli surexprimant la GMPK de S. cerevisiae peuvent être préparés de diverses façons, parmi lesquelles on peut citer, la lyse au lysozyme en présence d'EDTA, l'utilisation d'appareils de broyage de type Menton-Golin, French Press, X-Press, ou l'action des ultrasons. Plus particulièrement, les extraits acellulaires des souches de E. coli surexprimant la GMPK de S. cerevisiae ont été préparés de la façon suivante :

- 10 La souche de E. coli BL21 (DE3) pGUK-1 est cultivée comme cela est décrit par M. Konrad dans J. Biol. Chem. 267 p25652 en 1992. Après centrifugation (5000 x g ; 20min), les cellules obtenues à partir de 1 l de culture sont resuspendues dans 20 ml de tampon Tris/HCl 20mM pH 7.5, contenant 1mM EDTA et soniquées durant 4 min à 4°C. Après centrifugation (50 000 x g ; 1h) le surnageant est injecté sur une
- 15 colonne MONO Q HR 10/10 (Pharmacia) équilibrée dans le tampon Tris/HCl 20 mM pH 7.5. Les proteines sont éluées avec un gradient linéaire de 0 à 500 mM NaCl dans le tampon Tris/HCl 20mM pH 7.5. Les fractions contenant l'activité GMPK sont regroupées et concentrées, puis chromatographiées sur une colonne de Superdex 75 HR16/10 (Pharmacia) éluee par du tampon Tris/HCl 50mM pH 7.5,
- 20 150 mM NaCl. Les fractions contenant l'activité GuK sont regroupées. Après cette étape la préparation présente une seule bande visible en SDS-PAGE, après révélation au Bleu de Coomassie, et cette bande migre avec un poids moléculaire apparent de 21 000 environ.

L'activité de la GMPK est classiquement dosée en utilisant un protocole de dosage

- 25 décrit dans la littérature, Agarwal et coll. 1978 Meth. Enzymol. vol.LI p 483.

EXEMPLE 4 - Détermination des constantes cinétiques de la guanylate kinase de *S. cerevisiae*.

Les constantes cinétiques de la GMP kinase de levure purifiée comme décrit à l'exemple 3 sont déterminées dans les conditions de dosage enzymatique suivantes:

- 5 La GMP kinase de levure est incubée durant 10 min à 30°C dans 100 µl de tampon Tris/HCl 50 mM pH 7,8 contenant 4 mM ATP, 10 mM Mg Cl₂, 100 mM KCl, 1 mg/ml BSA (albumine bovine sérique) et 5-100 µM [8-3H]GCVMP (40 nCi/nmol) ou 200-3200 µM [8-3H]ACVMP (40 nCi/nmol). La réaction est stoppée par chauffage du mélange réactionnel durant 3 min à 80°C, 50 µl de tampon 10 mM
- 10 phosphate de potassium pH 3,5 sont ajoutés, et après centrifugation durant 2 min à 10 000 x g, 100 µl de surnageant sont analysés par chromatographie liquide haute pression (CLHP) dans le système suivant:

Phase stationnaire: Partisphère SAX (WHATMAN) - diamètre des particules : 5µm
- Dimensions : 4,6 x 125 mm.

15 **Phase mobile:**

Tampon A: KH₂PO₄ 0,01 M pH3,5 (ajusté à l'aide de H₃PO₄ concentré)

Tampon B: KH₂PO₄ 0,75 M pH3,5 (ajusté à l'aide de H₃PO₄ concentré)

Débit: 1ml/min

Gradient:

Minute	%A	%B
0	100	0

5	100	0
30	0	100
40	0	100
42	100	0
45	100	0

Détection:

UV: 265 nm

Radiochimique: détection du tritium

débit du scintillant (Optisafe 1 de Berthold) 1ml/min

- 5 our le calcul des constantes cinétiques, la quantité de GMP kinase de levure introduite dans la réaction enzymatique est ajustée de façon à transformer au maximum 10% du substrat introduit au départ. Les courbes de Michaelis sont ajustées aux points expérimentaux à l'aide du logiciel Grafit (Sigma). Les resultats sont presentes dans le Tableau 1. Ils montrent que la GMP kinase de levure est
- 10 capable de phosphoryler le GCVMP et l'ACVMP. De plus, elle présente une vitesse de phosphorylation du GCVMP 2 fois supérieure à l'enzyme humaine. De même, son affinité pour le GCVMP est supérieure d'un facteur au moins égal à 2 à l'affinité que présente l'enzyme humaine pour ce substrat. Au total, la valeur du V_{max}/K_m de l'enzyme de levure pour le GCVMP est 4,4 fois supérieure à la valeur que
- 15 présente l'enzyme humaine. Pour des substrats entrant en compétition, la constante V_{max}/K_m détermine la spécificité de l'enzyme vis à vis de ces substrats. Elle est

connue sous le nom de " specificity constant " [A. Fersht, Enzyme Structure and Mechanism, 1985, W. H. Freeman and Co., London].

De la même manière, la GMP kinase de levure présente une capacité à phosphoryler l'ACVMP très supérieure à l'enzyme humaine. La valeur du V_{max}/K_m de l'enzyme de levure pour l'ACVMP est 7 à 9 fois supérieure à la valeur que présente l'enzyme humaine pour ce substrat.

EXEMPLE 5 - Couplage des activités enzymatiques TK, GMPK et NDK :

Dans un mode préférentiel de couplage, l'incubation est effectuée dans 100 μ l de tampon Tris/HCl 50mM pH 7.8, contenant 1mg/ml de BSA (albumine sérique bovine), 5mM ATP, 4mM $MgCl_2$, 12mM KCl, 2mM DTT, 600 μ M EDTA, 100 μ M [8-3H]-GCV (40nCi/nmol) ou 100 μ M [2-3H]-ACV 40nCi/nmol et différentes quantités de TK, GuK et NDPK (Cf Tableau 2). Les NDPK de 3 organismes ont été utilisées (enzymes commercialisées par SIGMA), comme indiqué dans le tableau 2.

Le couplage des enzymes HSV1-TK et GMPK de *S. cerevisiae* permet une phosphorylation à 90% du ganciclovir en ganciclovir diphosphate. Et la nucléoside diphosphokinase de levure de boulanger, c'est-à-dire de *S. cerevisiae*, couplée aux enzymes HSV1-TK et GMPK, permet la phosphorylation en ganciclovir triphosphate avec une meilleure activité que ne le permet la nucléoside diphosphokinase humaine d'érythrocytes. Des résultats comparables sont obtenus avec l'acyclovir. Ces résultats démontrent clairement (a) que la combinaison d'enzymes selon l'invention apporte une amélioration significative de la phosphorylation, indiquant que la seule modification de la TK ne pourrait suffire pour améliorer les propriétés du système, (b) que le système de l'invention permet d'augmenter l'efficacité de traitement par gène suicide TK (c) que certaines

enzymes non-humaines possèdent une meilleure activité pour les analogues de nucleosides, rendant leur utilisation particulièrement avantageuse.

EXEMPLE 6 - Purification de la protéine de fusion HSV1-TK/ *S.cerevisiae*GMPK

- Les extraits acellulaires des souches de *E. coli* surexprimant la protéine de fusion peuvent être préparés de diverses façon, parmi lesquelles on peut citer, la lyse au lysozyme en présence d'EDTA, l'utilisation d'appareils de broyage de type Menton-Golin, French Press, X-Press, ou l'action des ultrasons. Plus particulièrement, les extraits acellulaires des souches de *E. coli* surexprimant la protéine de fusion ont été préparés de la façon suivante:
- 10 La souche de *E. coli* BL21 DE3 pXL3098 est cultivée en milieu LB. Après centrifugation (5000xg;20min), les cellules obtenues à partir de 1l de culture sont resuspendues dans 20ml de tampon A:Tris/HCl 50mM pH 7.8, contenant DTT 5mM, MgCl₂ 4mM, Glycérol 10% (v/v), Benzamidine 2mM, E64 50µl/l (solution à 100µg/l N-[N-(L-3-*trans*-carboxyoxiran-2-carbonyl)-L-leucyl]-4-aminobutylguanidine, Péfabloc 0,2mM, STI (Soybean trypsin inhibitor), Leupeptin 2mg/ml, et soniquées durant 4min à 4°C. Après centrifugation (50000xg; 1h) le surnageant est injecté sur une colonne MONO Q HR 10/10 (Pharmacia) équilibrée dans le tampon A. Les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de 0 à 400 mM NaCl dans le tampon Tris/HCl 20mM pH 7.5. Les fractions contenant l'activité TK et GMPK sont regroupées et concentrées puis chromatographiées sur une colonne de Superdex 200 HILoad 26/60 (Pharmacia) éluee par du tampon A contenant 150mM de NaCl. Les fractions contenant l'activité TK et GMPK sont regroupées. A cette étape la préparation présente une seule bande visible en SDS-PAGE, après révélation au Bleu de Coomassie, et cette bande migre avec un poids moléculaire apparent de 25 61000 environ.

EXEMPLE 7 - Etude de phosphorylation par la fusion HSV1-TK/GMPK

Cet exemple décrit une étude des paramètres cinétiques de phosphorylation du GCV et de l'ACV de la fusion, comparée aux paramètres cinétiques obtenus avec les protéines HSV1-TK et GMPK de *S. cerevisiae*.

5 7.1. Dosage de l'activité TK

L'activité de la TK est dosée comme suit: un extrait enzymatique contenant environ 0,1 unité de TK est incubé durant 15min à 37°C dans 100µl de tampon Tris/HCl 50 mm pH 7,8 contenant 1mg/ml de BSA (albumine bovine sérique), 5mM ATP, 4mM MgCl₂, 12mM KCl, 2mM DTT, 600µM EDTA et 100µM de GCV + [8-3H]-GCV
10 40nCi/nmol. La réaction est arrêtée par l'ajout de 10µl de tampon Tris/HCl 50mM pH 7,8 contenant 1mM de thymidine non radioactive. Les espèces phosphorylées sont fixées sur une colonne de DEAE sephadex (400µl de gel) puis, après lavage de la colonne, ces espèces sont éluées par 2ml d'HCl 1M. La radioactivité dans l'échantillon est ensuite comptée par scintillation liquide.

15 7.2. Dosage de l'activité GMPK

L'activité de la GMPK est classiquement dosée en utilisant un protocole de dosage décrit dans la littérature, K.C.Agarwal et al. (Methods In Enzymology (1978) Vol. LI 483-490).

20 7.3. Dosage de l'activité de la protéine de fusion et de la co-incubation des enzymes TK et GMPK

La capacité de la protéine de fusion TK-GMPK à transformer le GCV ou l'ACV en GCVDP ou ACVDP par rapport à un mélange synthétique de TK et de GMPK est déterminée de la façon suivante:

L'incubation a lieu dans 200µl de tampon Tris/HCl 50mM pH 7.8 contenant 1mg/ml de BSA (sérum albumine bovine), 5mM ATP, 4mM MgCl₂, 12m MKCl, 2mM DTT, 600µM EDTA, 1 à 100µM de GCV+[8-3H]GCV (40nCi/nmol) ou 1 à 100µM d'ACV+[2-3H] ACV 40nCi/nmol et de différentes quantités de TK, GMPK et les quantités équivalentes en protéine de fusion. La réaction est arrêtée en chauffant 3min à 80°C, après centrifugation 100µl d'incubat sont analysés dans le système suivant:

Phase stationnaire: Partisphère SAX (WHATMAN) - diamètre des particules : 5µm.

Dimensions : 4,6 x 125 mm.

10 **Phase mobile:**

Tampon A: KH₂PO₄ 0,01 M pH3,5 (ajusté à l'aide de H₃PO₄ concentré)

Tampon B: KH₂PO₄ 0,75 M pH3,5 (ajusté à l'aide de H₃PO₄ concentré)

Debit: 1ml/min

Gradient:

Minute	%A	%B
0	100	0
5	100	0
30	0	100
40	0	100
42	100	0
45	100	0

Détection:

UV: 265 nm

Radiochimique: détection du tritium
 débit du scintillant (Optisafe 1 de Berthold) 1ml/min

- 5 Le couplage et la combinaison des enzymes HSV1-TK et GMPK de *S. cerevisiae* permettent la phosphorylation du ganciclovir en ganciclovir diphosphate (voir tableau 3). Des résultats comparables sont obtenus avec l'acyclovir (voir tableau 3).

- Ces résultats montrent clairement que la protéine de fusion TK-GMPK conserve les propriétés des deux enzymes originales. De plus, suivant les conditions opératoires,
10 la protéine de fusion TK-GMPK apporte une amélioration significative de la phosphorylation a) allant jusqu'à un facteur 1,8, pour le GCV b) allant jusqu'à un facteur 1,2 pour l'ACV par rapport à la coincubation des enzymes TK sauvage et GMPK.

- La protéine de fusion permet in vivo une colocalisation des activités enzymatiques
15 dans la cellule, les enzymes séparées se répartissant, dans le noyau pour l'HSV1-TK et dans le cytosol pour la GMPK. Cette construction permet donc d'augmenter l'efficacité de traitements par gène suicide.

- L'ensemble de ces résultats démontre clairement l'intérêt thérapeutique de la présente invention, permettant à la fois de diminuer les doses de nucléoside et
20 d'enzymes et d'obtenir un bénéfice pharmacologique important.

LISTE DE SEQUENCES

- 5 (1) INFORMATIONS GENERALES:
- 10 (i) DEPOSANT:
(A) NOM: RHONE POULENC RORER S.A.
(B) RUE: 20, Avenue Raymond Aron
(C) VILLE: ANTONY
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 92165
(G) TELEPHONE: 01.55.71.70.36
(H) TELECOPIE: (01.55.71.72.91
- 15 (ii) TITRE DE L' INVENTION: COMBINAISONS D'ENZYMES POUR LA
DESTRUCTION DE CELLULES PROLIFERATIVES
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 9
- 20 (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:
(A) TYPE DE SUPPORT: Tape
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
25 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:
- 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 31 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:
GAGAAGCTTG CCATGGCCCG TCCTATCGTA A 31
- 40 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:
- 45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 28 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 50 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:
GAGGATCCGT TTGACGGAAG CGACAGTA 28

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

AAGGATCCAC CATGGCTAGT CAAACAGAAA

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

AAGAATTCAG ATCTTCATTC ATAAATCCA

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 53 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CCGGGAGATG GGGGAGGCTA ACGGAGGTGG CGTTCTGGT GGCGGAGGCT CCG

53

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 53 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

5 GATCCGGAGC CTCCGCCACC AGAACCGCCA CCTCCGTTAG CCTCCCCCAT CTC 53

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 36 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
15 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

20 GAGAATTCCG GAGGCGGTGG CTCCCGTCCT ATCGTA 36

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 28 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GAGGATCCGT TTGACGGAAG CGACAGTA 28

35 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 14 acides aminés
40 (B) TYPE: acides aminés
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

45 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

Tableau 1 - CONSTANTES CINÉTIQUES DES GUANYLATE KINASES DE LEVURE
ET D'ERYTHROCYTES HUMAINS POUR LE GCVMP ET L'ACVMP

Substrat	Guanylate kinase de levure (<i>S. cerevisiae</i>)			Guanylate kinase humaine (erythrocytes)		
	Km (μ M)	Vmax (μ mol/min/mg)	Vmax/Km	Km (μ M)	Vmax (μ mol/min/mg)	Vmax/Km
GCVMP	18	40	2.2	40 ^a 42-54 ^b	20 ^a	0.5 ^a
ACVMP	280	22	0.08	218 ^a	1.9 ^a	0.009 ^a
				209-753 ^b 330 ^c	3,6 ^c	0,011 ^c

Tableau 2 - COUPLAGE TK-GMPK-NDPK : % PAR NI DES PRODUITS FORMES

SUBSTRAT 100 µM	TK	GMPK	NDPK			% par NI DES PRODUITS FORMES				TEMPS D'INCUBATION min
			LEVURE de BOULANGER	HUMAINE (Erythrocyte)	BOVINE (Foie)	N	NMP	NDP	NTP	
GCV	Qté (µg)	Qté (µg)	Qté (µg)	Qté (µg)	Qté (µg)					
	10,4	7,4				3,9	5,3	90,8		30
	2,6	2,5				3,5	7,5	89,0		30
	1,3	2,5				2,9	4,4	92,7		60
	10,4	7,4	1,5			1,1	0,9	6,9	91,1	30
	10,4	7,4	0,75			2,9	2,6	12,6	82,9	20
	1,3	2,5	0,75			3,9	3,2	13,8	79,1	60
	10,4	7,4		0,675		2,0	6,2	90,3	1,5	20
	"	"		6,75		2,4	2,5	71,1	24,0	30
	"	"			0,5	2,2	6,5	78,4	12,9	20
ACV	"	"			5	1,9	0,6	5,8	92,0	30
	11,7	74				20,0	26,0	54,0		20
	"	"	1,5			19,0	13,0	60,0	8,0	20
	"	"	15			13,0	1,4	4,6	81,0	30
	"	"		6,75		18,0	1,8	80,0	<0,4	30
	"	"			5	15,0	1,7	82,0	1,3	30

Tableau 3: Phosphorylation du GCV et de l'ACV par le couplage ou la combinaison des enzymes TK et GMPK

Substrat	Fusion 200µg	Mélange	Fusion 2µg	Mélange sauvage/GMPK	Mélange
GCV 100µM		2-865/H12/GMPK 133/66µg (resp.)		1.66/0.33µg (resp.)	2-865:H12/GMPK 1.66/0.33µg (resp.)
GCV 50µM			8270**	4660**	
ACV 100µM	18500**	17260**	4900**		5300**

	Fusion 50µg	Mélange		Mélange sauvage/GM	
		2-865:H12/GMPK 33/17µg (resp.)		33/17µg (resp.)	
ACV 20µM	1220**	2325**		1045**	
ACV 50µM	2920**	3680**		2390**	
ACV 50µM Incub 1h	6740**	5890**			

**pmol de GCVDP formées

REVENDICATIONS

1. Composition pour la delivrance et la production in vivo d'une combinaison d'enzymes, comprenant:

5 - un premier acide nucleique codant pour une enzyme capable de phosphoryler un analogue de nucleoside, pour generer un analogue monophosphate,

 - un deuxieme acide nucleique codant pour une enzyme capable de phosphoryler ledit analogue monophosphate, pour generer un analogue diphosphate, et,

10 - un troisieme acide nucleique codant pour une enzyme capable de phosphoryler ledit analogue diphosphate, pour generer un analogue triphosphate toxique.

2. Composition selon la revendication 1 caracterisée en ce que le premier acide nucleique code pour une thymidine kinase.

15 3. Composition selon la revendication 1 caracterisée en ce que le deuxieme acide nucleique code pour une guanylate kinase.

4. Composition selon la revendication 1 caracterisée en ce que le troisieme acide nucleique code pour une nucléoside diphosphate kinase.

20 5. Composition selon la revendication 1 caracterisée en ce que les acides nucleiques sont portes par un meme vecteur.

6. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que les acides nucléiques sont portés par plusieurs vecteurs.
7. Composition selon la revendication 5 ou 6 caractérisée en ce que les vecteurs sont des vecteurs plasmidiques ou viraux.
- 5 8. Composition comprenant un acide nucléique codant pour une thymidine kinase et un second acide nucléique codant pour une nucléoside diphosphate kinase.
9. Composition selon la revendication 8 caractérisée en ce que la nucléoside diphosphate kinase est d'origine eucaryote non-humaine.
- 10 10. Composition selon la revendication 9 caractérisée en ce que la nucléoside diphosphate kinase est choisie parmi la NDPK de levure ou de boeuf.
11. Composition selon la revendication 10 caractérisée en ce que l'acide nucléique codant pour la thymidine kinase et l'acide nucléique codant pour la nucléoside diphosphate kinase sont couplés et codent pour une protéine portant
15 à la fois les activités TK et NDPK.
12. Composition selon la revendication 8 comprenant en outre un acide nucléique codant pour une guanylate kinase.
13. Composition selon la revendication 12 caractérisée en ce que l'acide nucléique code pour une guanylate kinase de levure.
- 20 14. Composition comprenant un acide nucléique codant pour une thymidine kinase et un second acide nucléique codant pour une guanylate kinase non humaine.

15. Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce que la guanylate kinase est d'origine levure.

16. Composition selon la revendication 15 caractérisée en ce que l'acide nucleique codant pour la thymidine kinase et l'acide nucleique codant pour la guanylate kinase sont couplés et codent pour une protéine portant à la fois les activités TK et GUK.

17. Composition selon l'une des revendications 1 à 16 caractérisée en ce que la thymidine kinase est d'origine virale.

18. Vecteur comprenant:

- un premier acide nucleique codant pour une thymidine kinase, et,
- un deuxième acide nucleique codant pour une guanylate kinase non-humaine.

19. Vecteur comprenant:

- un premier acide nucleique codant pour une thymidine kinase, et,
- un deuxième acide nucleique codant pour une nucléoside diphosphate kinase.

20. Vecteur selon la revendication 19 caractérise en ce que la nucléoside diphosphate kinase est d'origine eucaryote non-humaine, de préférence bovine ou levure.

21. Vecteur selon la revendication 19 ou 20 caractérise en ce qu'il comprend en outre un acide nucleique codant pour une guanylate kinase.

22. Vecteur selon l'une des revendications 18 a 21 caracterise en ce que la thymidine kinase est d'origine virale.
23. Vecteur selon les revendications 18 a 22 caracterise en ce que les differents acides nucleiques sont places sous le controle de promoteurs distincts.
- 5 24. Vecteur selon les revendications 18 a 22 caracterise en ce que les differents acides nucleiques forment une unite polycistronique sous le controle d'un promoteur unique.
25. Vecteur selon les revendications 18, 22 et 24 comprenant un premier acide nucleique codant pour une thymidine kinase d'origine virale et un deuxieme
10 acide nucleique codant pour une guanylate kinase non-humaine, lesdits acides nucleiques étant couplés et codant pour une protéine portant à la fois l'activité TK et GUK.
26. Vecteur selon les revendications 18 a 25 caracterise en ce qu'il s'agit d'un vecteur plasmidique ou viral.
- 15 27. Composition comprenant
- . une combinaison d'enzymes capables de triphosphoryler un analogue de nucleoside, et
 - . ledit analogue de nucleoside,
- en vue d'une administration simultanée, séparée, ou étalée dans le temps.
- 20 28. Composition pour la production in vivo d'un analogue de nucleoside triphosphate comprenant, conditionnes separement ou ensemble :

- un analogue de nucleoside
 - un acide nucleique codant pour une thymidine kinase
 - un acide nucleique codant pour une guanylate kinase, et,
 - un acide nucleique codant pour une nucléoside diphosphate kinase.
- 5 29. Composition pour la production in vivo d'un analogue de nucleoside triphosphate comprenant, conditionnes separement ou ensemble :
- un analogue de nucleoside
 - un acide nucleique codant pour une thymidine kinase, et
 - un acide nucleique codant pour une nucléoside diphosphate kinase.
- 10 30. Composition selon les revendications 27 a 29 caracterisée en ce que l'analogue de nucleoside est un analogue de guanosine.
31. Composition selon la revendication 30 caracterisée en ce que l'analogue de guanosine est choisi parmi le ganciclovir, l'acyclovir et le penciclovir.
- 15 32. Composition comprenant une combinaison d'enzymes impliquées dans la phosphorylation de nucleosides, l'une au moins de ces enzymes etant d'origine eucaryote non-humaine.
33. Methode pour la destruction de cellules proliferatives comprenant l'administration auxdites cellules d'une combinaison d'enzymes comprenant une TK et une NDPK et d'un analogue de nucleoside.

34. Methode selon la revendication 33 caracterisée en ce que la combinaison comprend en outre une guanylate kinase.
35. Methode pour la destruction de cellules proliferatives comprenant l'administration auxdites cellules d'une combinaison d'enzymes comprenant
5 une TK et une GMPK non-humaine et d'un analogue de nucleoside.
36. Methode selon les revendications 33 a 35 caracterisée en ce que l'analogue de nucleoside est un analogue de guanosine.
37. Methode selon la revendication 36 caracterisée en ce que l'analogue de guanosine est choisi parmi le ganciclovir, lacyclovir et le penciclovir.
- 10 38. Methode selon les revendications 33 a 37 caracterisée en ce que les enzymes sont administrées aux cellules par administration d'acides nucleiques codant pour lesdites enzymes.
39. Procédé de triphosphorylation d'un analogue de nucleoside comprenant la mise en presence dudit analogue avec une combinaison d'enzymes, l'une au
15 moins d'entre elles etant d'origine levure.
40. Utilisation de la nucléoside diphosphate kinase ou d'un acide nucleique codant pour celle-ci, en combinaison avec une thymidine kinase ou un acide nucleique codant pour une thymidine kinase et un analogue de nucleoside, pour la preparation d'une composition pharmaceutique destinée a la destruction des
20 cellules proliferatives.
41. Acide nucléique codant pour une protéine de couplage entre une thymidine kinase d'origine virale et une guanylate kinase.

42. Acide nucléique selon la revendication 41 caractérisé en ce que la guanylate kinase est d'origine levure.
43. Acide nucléique codant pour une protéine de couplage entre une thymidine kinase d'origine virale et une nucléoside diphosphate kinase.
- 5 44. Protéine codée par un acide nucléique selon les revendications 41 à 43.

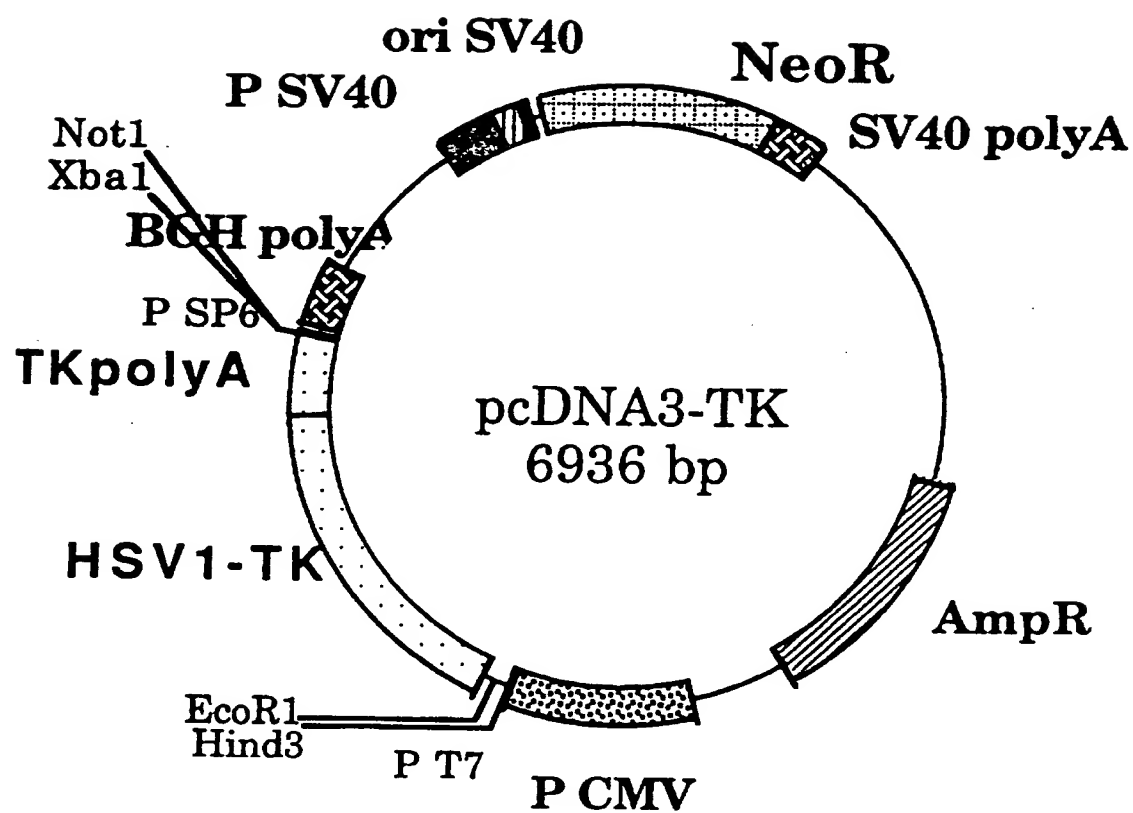


Figure 1

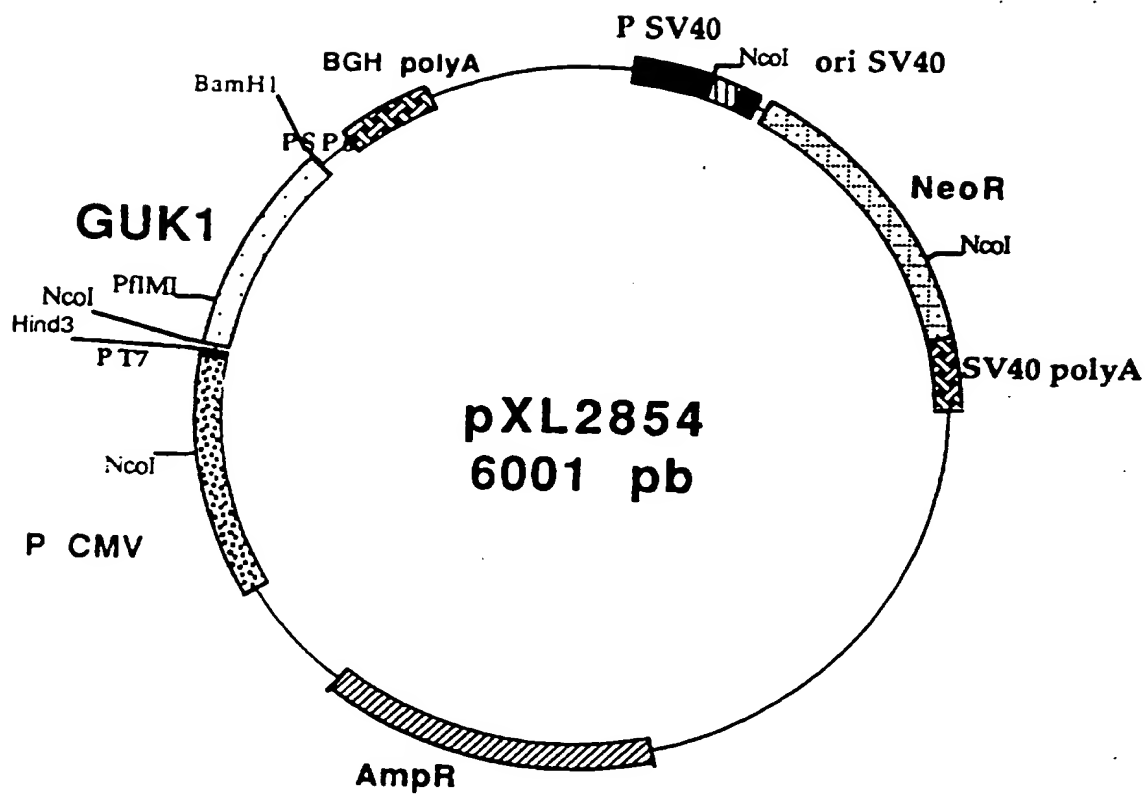


Figure 2

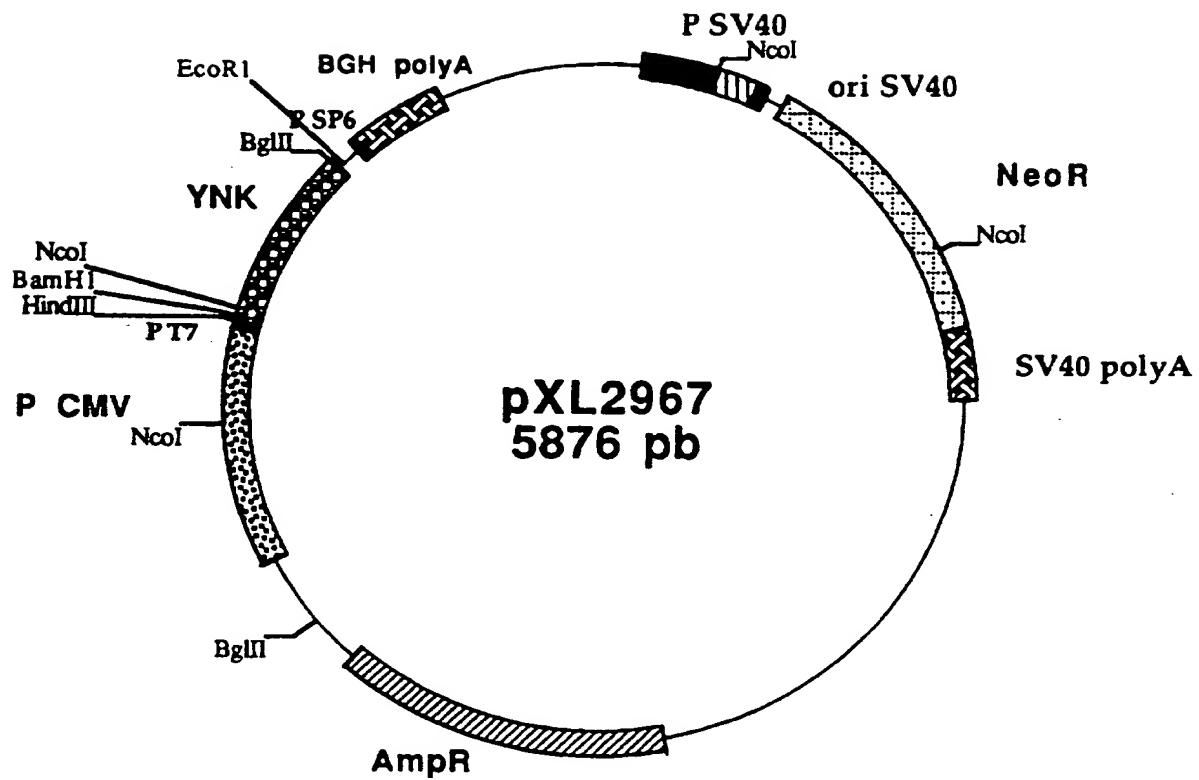


Figure 3

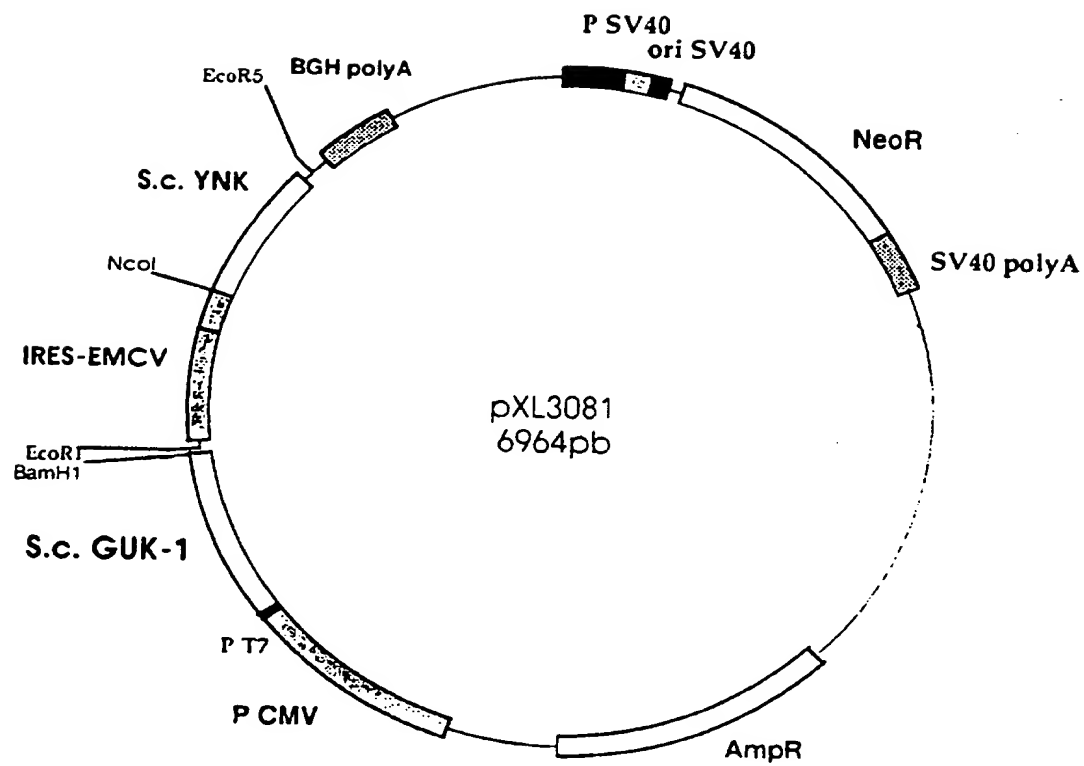


Figure 4

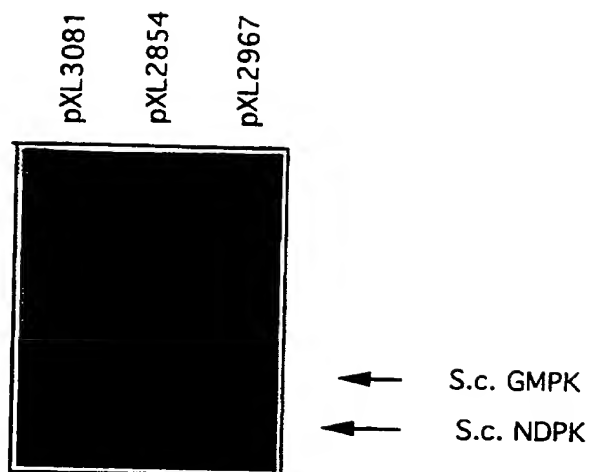


Figure 5

6/6

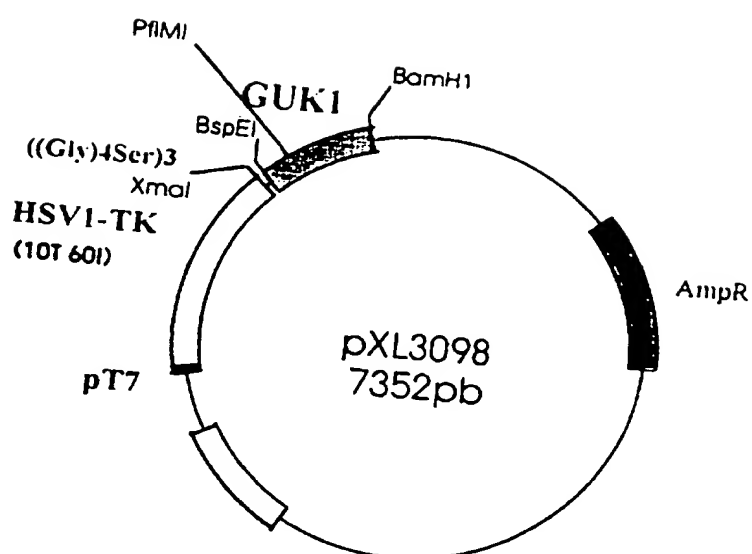


Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 97/00436

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: 6 C12N15/86 C12N9/12 A61K48/00 A61K38/45 C12P19/30 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: 6 C12N A61K C12P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VIROLOGY, vol. 206, no. 1, 10 January 1995 (10.01.95), ORLANDO US, pages 495-503, XP002019754 MANUEL CARUSO ET AL.: "Expression of a Tat-inducible Herpes Simplex-virus Thymidine kinase gene protects Acyclovir-treated CD4 cells from HIV-1 spread by conditional suicide and inhibition of reverse transcription" cited in the application see abstract see page 495, right hand column, paragraph 3 - page 496, left hand column, paragraph 3 see page 497, left hand column, last paragraph - page 498, left hand column, paragraph 2 see page 501, right hand column, paragraph 3 --- -/--	1-44
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<ul style="list-style-type: none"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family 		
Date of the actual completion of the international search 1 July 1997 (01.07.97)		Date of mailing of the international search report 11 July 1997 (11.07.97)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 97/00436

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 289 229 A (THE WELCOME FOUNDATION LIMITED) 2 November 1988 see page 2, line 1 - page 5, line 15 ---	1-44
A	WO 96 06176 A (UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE) 29 February 1996 see page 6, line 34 - page 11, line 10 ---	1-44
A	PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS, vol. 54, no. 3, 1992, pages 319-355, XP000610618 GLENN A. GENTRY: "Viral thymidine kinases and their relatives" see page 327, paragraph 3 - page 328, paragraph 2 ---	1-44
P,X	WO 96 16183 A (CAYLA) 30 May 1996 see page 1, line 7 - line 24 see page 5, line 17 - page 6, line 6 see page 8, line 3 - page 10, line 20 see page 12, line 28 - page 13, line 17 see page 13, line 30 - page 14, line 6 see page 14, line 19 - page 16, line 4; example 5 -----	8,9,14, 18-20, 23,24, 26,27, 29-33, 35-38,40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 97/00436

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although claims 33-38 concern a method for treatment of the human or animal body, inasmuch as they refer to an in-vivo method, the search was carried out, based on the alleged effects of the composition.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PC1/FR 97/00436

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 289229 A	02-11-88	DE 3868125 A JP 63280026 A	12-03-92 17-11-88
WO 9606176 A	29-02-96	FR 2723962 A EP 0777736 A	01-03-96 11-06-97
WO 9616183 A	30-05-96	AU 4180996 A	17-06-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem : Internationale No
PCT/FR 97/00436

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/86 C12N9/12

A61K48/00

A61K38/45

C12P19/30

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A61K C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>VIROLOGY, vol. 206, no. 1, 10 Janvier 1995, ORLANDO US, pages 495-503, XP002019754 MANUEL CARUSO ET AL.: "Expression of a Tat-inducible Herpes Simplex-virus Thymidine kinase gene protects Acyclovir-treated CD4 cells from HIV-1 spread by conditional suicide and inhibition of reverse transcription" cité dans la demande voir abrégé voir page 495, colonne de droite, alinéa 3 - page 496, colonne de gauche, alinéa 3 voir page 497, colonne de gauche, dernier alinéa - page 498, colonne de gauche, alinéa 2 voir page 501, colonne de droite, alinéa 3</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-44

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée).
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "A" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 Juillet 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11.07.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Montero Lopez, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. e Internationale No
PCT/FR 97/00436

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 289 229 A (THE WELCOME FOUNDATION LIMITED) 2 Novembre 1988 voir page 2, ligne 1 - page 5, ligne 15. ---	1-44
A	WO 96 06176 A (UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE) 29 Février 1996 voir page 6, ligne 34 - page 11, ligne 10 ---	1-44
A	PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS, vol. 54, no. 3, 1992, pages 319-355, XP000610618 GLENN A. GENTRY: "Viral thymidine kinases and their relatives" voir page 327, alinéa 3 - page 328, alinéa 2 ---	1-44
P,X	WO 96 16183 A (CAYLA) 30 Mai 1996 voir page 1, ligne 7 - ligne 24 voir page 5, ligne 17 - page 6, ligne 6 voir page 8, ligne 3 - page 10, ligne 20 voir page 12, ligne 28 - page 13, ligne 17 voir page 13, ligne 30 - page 14, ligne 6 voir page 14, ligne 19 - page 16, ligne 4; exemple 5 -----	8,9,14, 18-20, 23,24, 26,27, 29-33, 35-38,40

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

...mande internationale n°

PCT/FR 97/00436

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche
(suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°s 33-38 se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Bien que les revendications 33-38, en ce qu'elles se réfèrent à une méthode in-vivo, concernant un méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés à la composition.
2. ☐ Les revendications n°s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs au nombre de familles de brevets

Dem. e Internationale No

PCT/FR 97/00436

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 289229 A	02-11-88	DE 3868125 A JP 63280026 A	12-03-92 17-11-88
WO 9606176 A	29-02-96	FR 2723962 A EP 0777736 A	01-03-96 11-06-97
WO 9616183 A	30-05-96	AU 4180996 A	17-06-96

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)